Agilent 1260 Infinity
Binärer LC

Systemhandbuch

Agilent Technologies

Hinweise

© Agilent Technologies, Inc. 2006, 2008-2011, 2013

Die Vervielfältigung, elektronische Speicherung, Anpassung oder Übersetzung dieses Handbuchs ist gemäß den Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes ohne vorherige schriftliche Genehmigung durch Agilent Technologies verboten.

Microsoft ® - Microsoft is a U.S. registered trademark of Microsoft Corporation.

Handbuch-Teilenummer

G1312-92303

Ausgabe

02/2013

Gedruckt in Deutschland

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn, Germany

Dieses Produkt kann als Komponente eines In-vitro-Diagnosesystem eingesetzt werden, sofern das System bei den zuständigen Behörden registriert ist und den einschlägigen Vorschriften entspricht. Andernfalls ist es nur für den allgemeinen Laborgebrauch vorgesehen.

Softwareversion

Dieses Handbuch gilt für Version A.01.04 des Agilent OpenLAB CDS.

Windows ® ist ein in den USA eingetragenes Warenzeichen der Microsoft Corporation.

Gewährleistung

Agilent Technologies behält sich vor, die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen jederzeit ohne Vorankündigung zu ändern. Agilent Technologies übernimmt keinerlei Gewährleistung für die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen, insbesondere nicht für deren Eignung oder Tauglichkeit für einen bestimmten Zweck. Agilent Technologies übernimmt keine Haftung für Fehler, die in diesem Handbuch enthalten sind, und für zufällige Schäden oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Lieferung, Ingebrauchnahme oder Benutzung dieses Handbuchs. Falls zwischen Agilent und dem Benutzer eine schriftliche Vereinbarung mit abweichenden Gewährleistungs bedingungen hinsichtlich der in diesem Dokument enthaltenen Informationen existiert, so gelten diese schriftlich vereinbarten Bedingungen.

Technologielizenzen

Die in diesem Dokument beschriebene Hardware und/oder Software wird/werden unter einer Lizenz geliefert und dürfen nur entsprechend den Lizenzbedingungen genutzt oder kopiert werden.

Sicherheitshinweise

VORSICHT

Ein **VORSICHT**-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o.ä.aufmerksam, die bei falscher Ausführung zur Beschädigung des Produkts oder zum Verlust wichtiger Daten führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis **VORSICHT** gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden haben und diese erfüllt sind.

WARNUNG

Ein WARNUNG-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o. ä. aufmerksam, die bei falscher Ausführung zu Personenschäden, u. U. mit Todesfolge, führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis WARNUNG gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden haben und diese erfüllt sind.

Inhalt dieses Handbuchs...

Dieses Handbuch gilt für den Binären LC Agilent 1260 Infinity.

1 Der Binäre LC Agilent 1260 Infinity - Gerätebeschreibung

In diesem Kapitel werden die Funktionen des Binären LC 1260 Infinity beschrieben.

2 Einführung

Dieses Kapitel enthält eine Einführung zum Binären LC Agilent 1260 Infinity mit einer Vorstellung der zugrunde liegenden Konzepte.

3 Optimierung des Agilent 1260 Infinity Binary LC

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die Theorie anzuwenden ist und wie die Funktionen des LC-Systems zur Entwicklung optimierter Trennmethoden genutzt werden können.

4 Einrichtung und Installation

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Softwareinstallation, zur Installation der Module und zur Vorbereitung des Systems für den Betrieb.

5 Schnellstart-Anleitung

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Datenerfassung und Datenanalyse mit dem Binären LC 1260 Infinity.

6 Anhang

Dieses Kapitel enthält ergänzende Informationen zur Sicherheit, zum Internet, zur Einrichtung einer Methode sowie rechtliche Hinweise.

Inhalt

1 Der Binäre LC Agilent 1260 Infinity - Gerätebeschreibung 7

Eigenschaften und Funktionen des Agilent 1260 Infinity Binary LC 8
Systemkomponenten 10
Spezifikationen 22

2 Einführung 27

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie 28
Vorteile von Säulen mit kleiner Partikelgröße 34
Reibungserwärmung 37

3 Optimierung des Agilent 1260 Infinity Binary LC 39

Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens 40
Erzielen höherer Injektionsvolumina 47
Erzielen kürzerer Zykluszeiten 49
Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung 53
Erzielen einer höheren Auflösung 55
Erzielen einer höheren Empfindlichkeit 63
Verstopfung von Säulen vermeiden 68

4 Einrichtung und Installation 71

Installation der Software 72
Installation der Module 74

5 Schnellstart-Anleitung 85

Über die Schnellstart-Anleitung 86
Vorbereitung des Systems 87
Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle 92
Datenanalyse 100

6 Anhang 105

Sicherheitsinformationen 106
Informationen zu Lösungsmitteln 109
Agilent Technologies im Internet 114
Einrichtung einer Methode mithilfe von Ganze Methode bearbeiten 115

1
Der Binäre LC Agilent 1260 Infinity - Gerätebeschreibung

Eigenschaften und Funktionen des Agilent 1260 Infinity Binary LC 8
Systemkomponenten 10
Binäre Pumpe 1260 Infinity (G1312B) 11
Hochleistungsentgaser 1260 Infinity (G4225A) 14
Automatischer Hochleistungsprobengeber 1260 Infinity (G1367E) 15
Säulenthermostat 1290 Infinity (G1316C) 17
Diodenarray-Detektor 1260 Infinity (G4212B) 19
Schnellwechselventile der Serie 1200 Infinity 21
Spezifikationen 22

In diesem Kapitel werden die Funktionen des Binären LC 1260 Infinity beschrieben.

Eigenschaften und Funktionen des Agilent 1260 Infinity Binary LC

Mit dem Binären LC 1260 Infinity wurde ein Flüssigkeitschromatograph entwickelt, der extrem schnelle Trennungen mit hoher Auflösung ermöglicht und dabei die vollständige Funktionalität für HPLC-Standardanwendungen beibehält. Er bietet daher volle Rückwärtskompatibilität für Ihre bewährten HPLC- und UHPLC-Methoden. Bei der Verwendung von Sub-2-µm-Partikeln (STM) ist für hohe Flussraten oder lange Säulen zusätzlicher Druck erforderlich, um die mobile Phase durch die Säule zu pressen. Der Flussweg des Binären LC 1260 Infinity ist so optimiert, dass ein minimaler Rückdruck entsteht. Außerdem wird durch die spezielle Partikelgrößenverteilung in den ZORBAX-RRHT-Säulen ein signifikant geringerer Rückdruck erzeugt als in anderen STM-Säulen.

Der Binäre LC Agilent 1260 Infinity besticht durch folgende Designmerkmale und Vorteile:

- Das bis zu einem Mindestwert von 120 µL konfigurierbare Verzögerungsvolumen der Binären Pumpe 1260 Infinity sorgt in Kombination mit einem Flussbereich von 0,05 bis 5 mL/min bei einem Druck von bis zu 600 bar für ein breites Anwendungsspektrum. Durch die Einsatzmöglichkeit von Narrowbore-Säulen (ID 2,1 mm) bis zu Standardbore-Säulen (ID 4,6 mm) sind die Erfordernisse von LC- sowie LC/MS-Anwendungen abgedeckt.
- Die Konfiguration für das Standard-Verzögerungsvolumen der Binären Pumpe 1260 Infinity ermöglicht die Durchführung nicht nur von UHPLC-Methoden, sondern auch von herkömmlichen HPLC-Methoden ohne Leistungseinbußen oder Veränderung der chromatographischen Modelle.
- Mit dem neuartigen Durchflussdesign des Hochleistungsprobengebers 1260 Infinity wird eine maximale Präzision für einen weiten Bereich von Injektionsvolumina (von 0,1 bis 100 µL) ohne Wechseln der Probenschleifen erzielt. Das Gerät ist für einen hohen Probendurchsatz, geringe Verschleppung und schnelle Injektionszyklen konzipiert.
- Eine hohe Temperatur, auf bestimmten Säulen bis zu 100 °C, ermöglicht eine höhere Flexibilität bei der Selektivität und verringert die Viskosität des Lösungsmittels, wodurch eine noch schnellere Trennung erreicht wird.
- Im Säulenthermostat 1290 Infinity können andere Heizelemente (1,6 µL) und Kühlelemente (1,5 µL) für ein geringes Extrasäulenvolumen installiert werden. Die Temperatur ist von 10 °C unter Umgebungstemperatur bis zu 100 °C einstellbar.

- Das neuartige Design des Ausziehventilantriebs und die vom Benutzer austauschbaren Schnellwechselventile im Säulenthermostat 1290 Infinity erhöhen die Benutzerfreundlichkeit und ermöglichen Lösungen für extrem hohen Durchsatz, Multimethodenentwicklung und automatisierte Methodenentwicklung.
- Ein Schlauchkit für geringe Dispersion und Flusszellen mit kleinem Volumen minimieren die Peakdispersion für Narrowbore-Säulen.
- Basislinienstabilität und schnelle Spektrenaufnahme bei Datenraten bis 80 Hz durch das neue Optikdesign des Diodenarray-Detektors 1260 Infinity.
- Zur Verwendung mit Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 , 3,0 und 4,6 mm sind verschiedene UV-Detektor-Flusszellen verfügbar, darunter die revolutionäre Agilent Max-Light-Kartuschenzelle mit einer optischen Streckenlänge von 60 mm (typisches Rauschniveau: <±0,6 µAU/cm) für höchste Nachweisempfindlichkeit.

Eine schrittweise Aufrüstung von der Serie 1100 oder 1200 bis zum Binären LC Agilent 1260 Infinity ist möglich; so kann beispielsweise in Kombination mit einer Binären Pumpe 1260 Infinity weiterhin ein Detektor der Serie 1100 oder ein Säulenofen der Serie 1200 verwendet werden.

Systemkomponenten

Je nach den Erfordernissen Ihrer jeweiligen Anwendungen sind verschiedene Systemkonfigurationen des Binären LC 1260 Infinity möglich. Einige Konfigurationen werden in diesem Handbuch ausführlicher erläutert, siehe “Einrichtung und Installation” auf Seite 71. Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Module sind typische Komponenten eines Binären LCs 1260 Infinity. Zusätzlich zu diesen Kernkomponenten sind für spezielle Anwendungen individuelle Lösungen verfügbar. Einige sind im Kapitel "Optimierung" beschrieben.

Binäre Pumpe 1260 Infinity (G1312B)

Die binäre Pumpe weist zwei identische Pumpenkanäle auf, die in einem Gehäuse integriert sind. Durch Hochdruckmischung werden binäre Gradienten erstellt. Bei Anwendungen mit niedrigen Flussraten oder wenn ein minimales Transientenvolumen benötigt wird, können der Pulsationsdämpfer und der Mischer umgangen werden. Zu den typischen Anwendungen gehören Methoden mit hohem Durchsatz und schnellen Gradienten in 2,1 mm-Säulen mit hoher Auflösung. Die Pumpe liefert einen Flussbereich von 0,1 – 5 mL/min bei einem Druck von bis zu 600 bar. Ein Lösungsmittelauswahlventil (optional) ermöglicht die Bildung von binären Gemischen (isokratisch oder Gradient) aus je einem von zwei Lösungsmitteln pro Kanal. Für den Einsatz mit konzentrierten Pufferlösungen steht optional eine aktive Kolbenhinterspülung zur Verfügung.

Funktionsprinzip

Die binäre Pumpe basiert auf einem Zweikanalsystem mit je zwei in Serie geschalteten Kolben und bietet alle Grundfunktionen, die von einer Lösungsmittelpumpe erwartet werden. Die Dosierung der Lösungsmittel und die Weiterleitung zur Hochdruckseite werden von zwei Pumpeneinheiten durchgeführt, die einen Druck von bis zu 600 bar erzeugen können.

Jeder Kanal besteht aus einer Pumpeneinheit mit einem Pumpenantrieb, einem Pumpenkopf, einem aktiven Einlassventil mit einer austauschbaren Kartusche sowie einem Auslassventil. Die zwei Kanäle münden in eine Niedervolumen-Mischkammer. Die Mischkammer ist über eine Widerstandskapillarspule mit einer Dämpfereinheit und einem Mischer verbunden. Ein Drucksensor überwacht den Pumpendruck. Zum einfachen Spülen des Pumpensystems ist am Auslass der Pumpe ein Spülventil mit einer integrierten PTFE-Fritte angebracht.

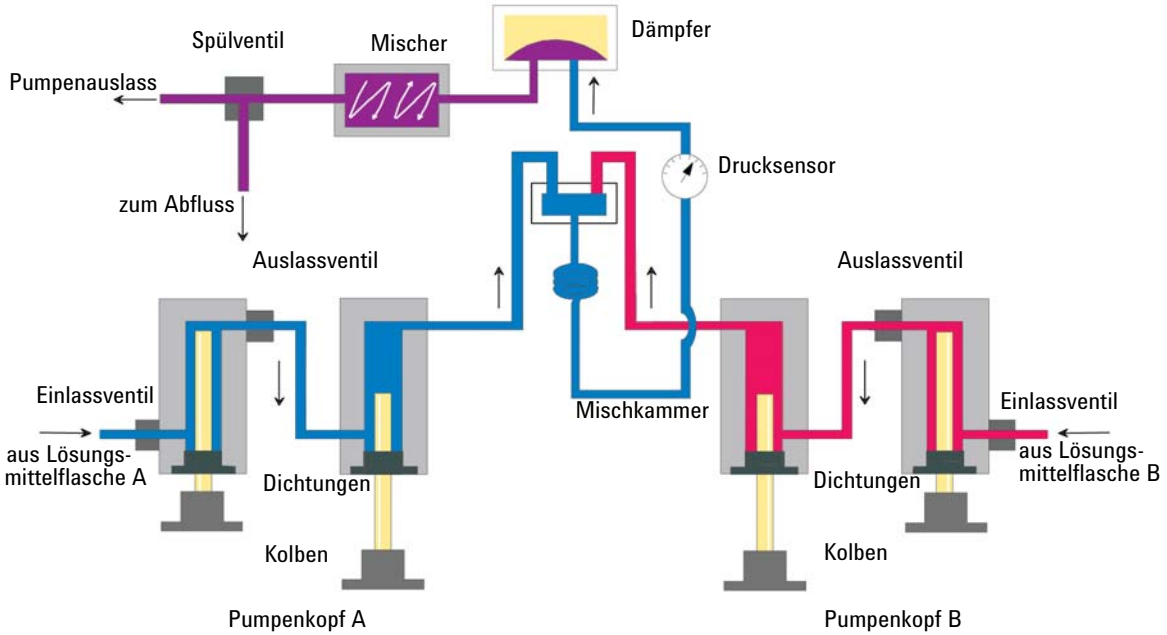


Abbildung 1 Der Hydraulikweg der binären Pumpe mit Dämpfer und Mischer

Der Dämpfer und der Mischer können zur Erzielung des minimalen Verzögerungsvolumens der binären Pumpe umgangen werden. Diese Konfiguration empfiehlt sich für Anwendungen mit niedrigen Flussraten und steilen Gradienten.

Abbildung 2 auf Seite 13 zeigt den Flussweg im Modus für geringes Verzögerungsvolumen. Eine Anleitung für den Wechsel zwischen den zwei Konfigurationen finden Sie im Benutzerhandbuch zur Binären Pumpe G1312B.

HINWEIS Es ist nicht möglich, nur den Mischer zu umgehen und den Dämpfer zu verwenden. Diese Konfiguration wird nicht unterstützt und könnte zu einer Fehlfunktion der binären Pumpe führen.

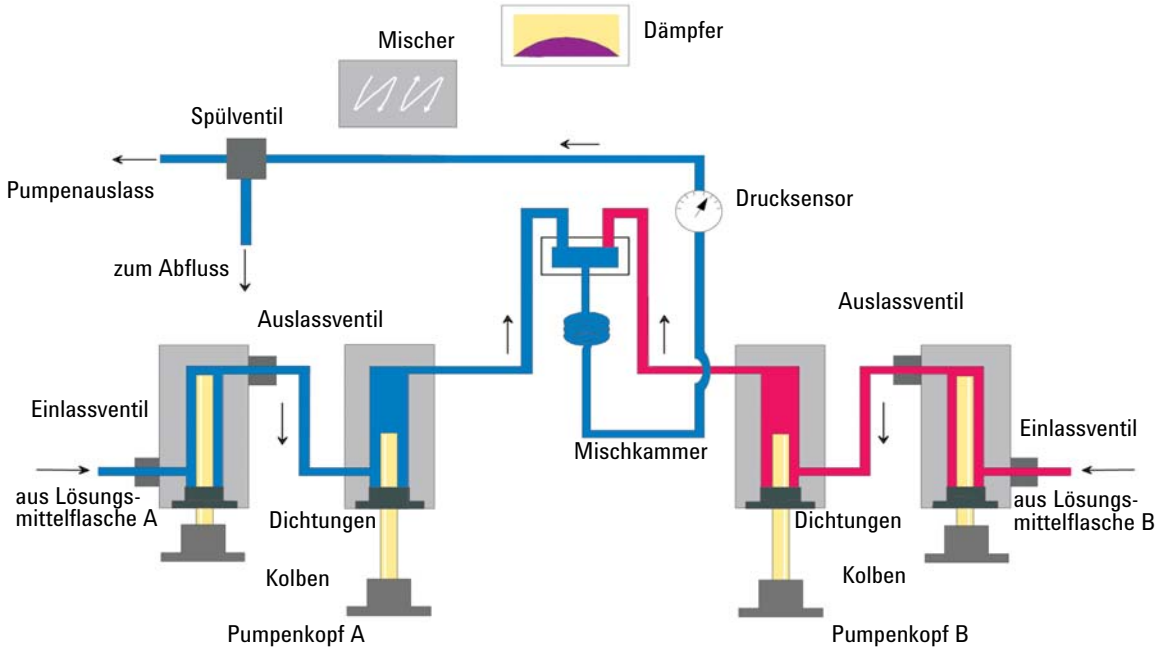


Abbildung 2 Der Hydraulikweg der binären Pumpe mit umgangenem Dämpfer und Mischer

Hochleistungsentgaser 1260 Infinity (G4225A)

Der Hochleistungsentgaser Agilent 1260 Infinity , Modell G4225A, umfasst vier separate Vakuumkammern mit semipermeablen Schläuchen, eine Vakuumpumpe und eine Steuerungseinheit. Beim Einschalten des Vakuumentgasers schaltet die Steuerungseinheit die Vakuumpumpe ein, welche einen Niederdruck in den Vakuumkammern erzeugt. Der Druck wird von einem Drucksensor gemessen. Der Vakuumentgaser hält den Niederdruck durch ein gesteuertes Leck im Lufteinlassfilter und durch die Regulierung der Vakuumpumpe über den Drucksensor.

Die LC-Pumpe saugt die Lösungsmittel aus den Flaschen durch die semipermeablen Schläuche der Vakuumkammern. Beim Durchlaufen der Lösungsmittel durch die Vakuumkammern dringt in den Lösungsmitteln gelöstes Gas durch die Schläuche in die Vakuumkammern ein. Die Lösungsmittel sind nach Verlassen der Auslässe des Vakuumentgasers entgast.

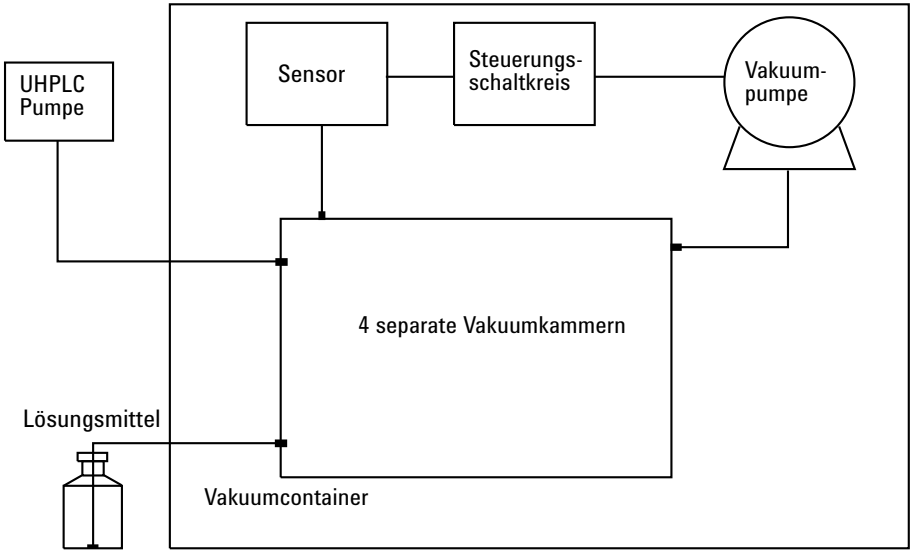


Abbildung 3 Schemazeichnung (nur einer der vier Kanäle ist gezeigt)

Automatischer Hochleistungsprobengeber 1260 Infinity (G1367E)

Funktionen

Der automatische Hochleistungsprobengeber 1260 Infinity zeichnet sich durch einen vergrößerten Druckbereich (bis zu 600 bar) aus, wodurch der Einsatz moderner Säulen (Sub-2-µm-Narrowbore-Säulen) mit dem Binären LC Agilent 1260 Infinity ermöglicht wird. Das Gerät bietet verbesserte Stabilität durch optimierte, neue Teile, hohe Geschwindigkeit mit geringster Verschleppung mittels Durchflussdesign, erhöhte Injektionsgeschwindigkeit für einen hohen Probendurchsatz, erhöhte Produktivität durch überlappenden Injektionsmodus und flexible, bequeme Probenhandhabung mit verschiedenen Probenbehälterarten wie beispielsweise Flaschen und Mikrotiterplatten. Die Verwendung von 384-Mikrotiterplatten ermöglicht die unabaufsichtigte Verarbeitung von bis zu 768 Proben.

Automatischer Probengeber (Prinzip)

Die Bewegungen der einzelnen Elemente des automatischen Probengebers werden während der Probenerfassung kontinuierlich vom zugehörigen Prozessor des automatischen Probengebers überwacht. Der Prozessor gibt die Zeitspannen und Wegbereiche jeder Bewegung vor. Wird ein bestimmter Schritt der Probenahmesequenz nicht vollständig durchgeführt, wird eine Fehlermeldung ausgegeben. Während der Probenahmesequenz wird das Lösungsmittel vom Injektionsventil am automatischen Probengeber vorbeigeleitet. Die Nadel bewegt sich an die gewünschte Probenposition und wird in die Probenflüssigkeit der Probe gesenkt, damit die Dosiereinheit das gewünschte Volumen abziehen kann, indem der Kolben eine bestimmte Distanz zurückgezogen wird. Die Nadel wird wieder angehoben und auf den Sitz gesetzt, um so die Probenschleife zu schließen. Diese Probe wird auf die Säule aufgetragen, wenn das Injektionsventil am Ende der Probenahme in die Injektionsstellung schaltet.

Der Standardablauf der Probenahme geschieht in folgender Reihenfolge:

1. Das Injektionsventil schaltet in die Nebenflussstellung.
2. Der Kolben der Dosiereinheit fährt in die Initialisierungsposition.
3. Die Nadelsperre bewegt sich nach oben.
4. Die Nadel bewegt sich zur gewünschten Probenflaschen- (oder Mikrotiterplatten-) position.
5. Die Nadel senkt sich in die Probenflasche (oder die Mikrotiterplatte).
6. Die Dosiereinheit entnimmt das voreingestellte Probenvolumen.

7 Die Nadel wird aus der Probenflasche (oder der Mikrotiterplatte) herausgehoben.

8 Die Nadel wird dann in den Sitz gesetzt, um so die Probenschleife zu schließen.

9 Die Nadelsperre bewegt sich nach unten.

10 Die Injektionssequenz ist abgeschlossen, wenn das Injektionsventil in die Injektionsstellung schaltet.

Eine Nadelreinigung ist bei Bedarf zwischen Schritt 7 und 8 vorzunehmen.

Injektionssequenz

Vor Beginn der Injektionssequenz und während der Analyse befindet sich das Injektionsventil in der Injektionsstellung. In dieser Position fließt die mobile Phase durch die Dosiereinheit, die Probenschleife und die Nadel des automatischen Probengebers. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Teile, die mit der Probe in Berührung kommen, während des Laufs gespült werden, wodurch Verschleppungen weitestgehend vermieden werden.

Zu Beginn der Probenahmesequenz schaltet das Ventil in die Nebenflussstellung. Lösungsmittel von der Pumpe tritt am Anschluss 1 in das Ventil ein und fließt direkt über Anschluss 6 zur Säule.

Der letzte Schritt der Probenahmesequenz umfasst die Injektion und den Analysenlauf. Das Ventil mit 6 Anschlüssen wird in die Injektstellung geschaltet und leitet den Fluss zurück in die Probenschleife, die jetzt eine bestimmte Probenmenge enthält. Der Lösungsmittelfluss transportiert die Proben auf die Säule und die Trennung beginnt. Dies ist der Beginn eines Analysenlaufs innerhalb einer Analyse. Zu diesem Zeitpunkt werden alle wichtigen, die Leistung beeinflussenden Komponenten, intern vom Lösungsmittelfluss gespült. Bei Standardanwendungen ist kein zusätzliches Spülverfahren erforderlich.

Reinigen der Nadel

Vor der Injektion und um die Verschleppung bei einer sehr empfindlichen Analyse zu reduzieren, kann die Nadelaußenfläche in einem Spülanschluss, der sich hinter dem Injektoranschluss auf der Probennahmeeinheit befindet, gereinigt werden. Sobald die Nadel im Spülanschluss sitzt, fördert eine Schlauchpumpe für eine bestimmte Zeit etwas Lösungsmittel, um die Außenseite der Nadel zu reinigen. Am Ende dieses Verfahrens fährt die Nadel zum Injektionsanschluss zurück.

Säulenthermostat 1290 Infinity (G1316C)

Der Säulenthermostat Agilent 1290 Infinity (TCC) reguliert die Temperatur zwischen 10 °C unter Umgebungstemperatur und bis zu 100 °C bei 2,5 ml/min bzw. 80 °C bei bis zu 5 ml/min. Die Spezifikation für die Temperaturstabilität beträgt ±0,05 °C, die Spezifikation für die Genauigkeit ±0,5 °C (kalibriert)[1]. Dies wird ermöglicht durch eine Kombination aus Wärmeleitung durch Kontakt mit den Ventilatorflügeln des Thermostats, der Temperatur der stehenden Luft in der Säulenumgebung und vor allem durch Vorheizen (oder -kühlen) der mobilen Phase, die durch einen Wärmetauscher fließt, bevor sie die Säule erreicht. Im Säulenthermostaten gibt es zwei unterschiedliche Temperaturzonen, die im Fall von langen Säulen (bis zu 300 mm) gekoppelt oder im Fall von kurzen Säulen (100 mm oder kürzer) bei unterschiedlichen Temperaturen betrieben werden können.

Das Modul wird mit einem 1,6 µl-Wärmetauscher für geringe Dispersion geliefert und die verschiedenen Ventilkits enthalten zusätzliche Wärmetauscher für geringe Dispersion für jede Säule. Bis zu 4 Wärmetauscher für geringe Dispersion können flexibel im Innern des Säulenthermostaten montiert werden. Für den konventionellen HPLC-Berieb sind außerdem integrierte 3 µl- und 6 µl-Wärmetauscher verfügbar.

Alle Säulenthermostaten können einen internen Ventilantrieb aufnehmen, der Umschaltanwendungen vom einfachen Umschalten zwischen zwei Säulen bis zur alternierenden Säulenregeneration, Probenvorbereitung oder Säulenrückspülung ermöglicht. Alle Ventilköpfe werden als komplettes Kit mit allen erforderlichen Kapillaren, zusätzlichen Wärmetauschern für geringe Dispersion und sonstigen Zubehörteilen geliefert.

Die Säulenschaltventile sind beim Herstellen von Verbindungen zum Ventil außergewöhnlich flexibel und bedienungsfreundlich: Auf Druck schiebt sich die Antriebseinheit des Schnellwechselventils nach vorne und ermöglicht so einen einfachen Zugang (siehe Abbildung 4 auf Seite 18 links). Alternative Ventilköpfe für unterschiedliche Anwendungen können vom Anwender am Antriebsmechanismus ausgetauscht werden (siehe Abbildung 4 auf Seite 18 rechts). Beachten Sie das RFID-Tag am Ventilkopf.

[1] Alle Spezifikationen gelten für destilliertes Wasser bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C, einem Sollwert von 40 °C und einen Flussbereich von 0,2 bis 5 mL/min.

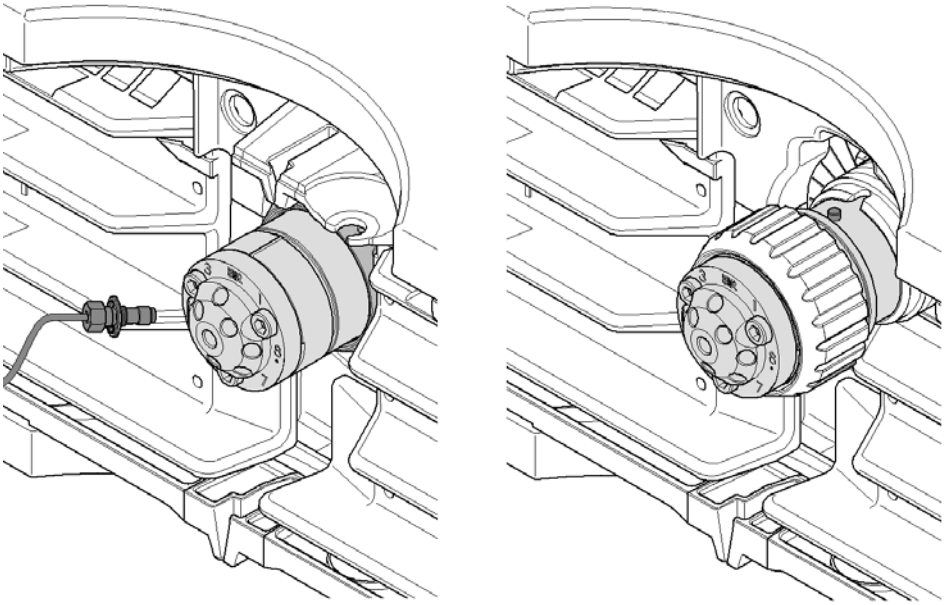


Abbildung 4 Schnellwechselventil im Säulenthermostaten

Bis zu drei Säulenthermostaten können "geclustert" werden, was erweiterte Anwendungen wie das Umschalten zwischen acht Säulen bei der automatisierten Methodenentwicklung oder das Anschließen von zusätzlichen Säulen für unterschiedliche Anwendungen ermöglicht. So wird die zu verwendende Säule einfach zu einem Methodenparameter. Dies erfordert zwei 8-Positionen-/9-Anschlüsse-Ventilköpfe, jeweils einen in zwei Säulenthermostaten. Geclusterte Säulenthermostaten werden zur leichteren Bedienung von der Software als eine Einheit mit einer Schnittstelle behandelt.

Weitere Verbesserungen im Vergleich zu früheren Konstruktionen betreffen die thermische Isolierung, die Kapillarführungen und ein "Tür-offen"-Sensor, so dass in Methoden festgelegt werden kann, dass die Tür geschlossen werden muss, was insbesondere bei Hochtemperaturmethoden nützlich ist.

Diodenarray-Detektor 1260 Infinity (G4212B)

Der Diodenarray-Detektor 1260 Infinity (DAD) basiert auf einem neuen optischen Design und enthält eine Kartuschenzelle mit Optofluid-Wellenleitern, die hohe Empfindlichkeit bei geringer Dispersion, einen breiten linearen Bereich und eine sehr stabile Basislinie für standard- oder ultraschnelle LC-Anwendungen bietet. Die Agilent Max-Light-Kartuschenzelle erhöht die Lichttransmission drastisch. Dazu nutzt sie das Prinzip der inneren Totalreflexion entlang einer nicht beschichteten Kieselgelkapillare, was zu einem völlig neuen Grad an Empfindlichkeit führt, ohne dass wegen Dispersionseffekten aufgrund des Zellenvolumens auf Auflösung verzichtet werden muss. Durch dieses Design werden Störungen der Basislinie, die durch Brechungsindexeffekte oder thermische Effekte verursacht werden, auf ein Minimum begrenzt, was eine verlässlichere Integration der Peakflächen ermöglicht.

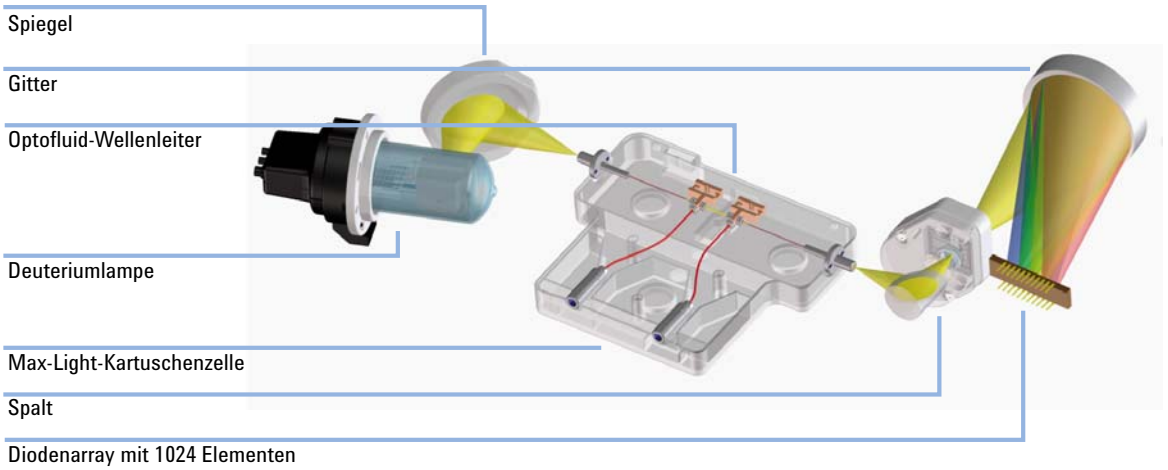


Abbildung 5 Lichtweg durch den DAD

Das Modul umfasst außerdem eine elektronischen Temperatursteuerung, die Effekte durch die Umgebungstemperatur weiter reduziert. Obwohl das hydraulische Volumen der Max-Light-Kartuschenzelle sehr klein ist, hat sie die Standard-Streckenlänge von 10 mm. Als Alternative mit noch höherer Empfindlichkeit ist die Agilent Max-Light-Hochempfindlichkeitszelle mit einer Streckenlänge von 60 mm verfügbar. Die Zellen können bequem ausgetauscht werden, da sie sich leicht in den Zellenhalter hinein oder aus ihm heraus schieben lassen und an der optischen Bank automatisch ausgerichtet werden. Die Lichtquelle des DAD ist eine Deuteriumlampe mit einem Betriebswellen-

längenbereich von 190 bis 640 nm. Das Licht wird von einem Diodenarray-Detektor mit 1024 Dioden detektiert. Den Eingang in den Spektrographen bildet ein fixierter optischer Spalt von 4 nm.

Die chromatographischen Signale werden aus den Diodenarray-Daten in der Firmware des Moduls extrahiert. Es können bis zu acht einzelne Signale definiert werden. Jedes davon umfasst eine Signalwellenlänge, eine Dioden-Bunching-Bandbreite und gegebenenfalls eine Referenzwellenlänge und -bandbreite. Signale können mit 80 Hz (80 Datenpunkte/Sekunde) ausgegeben werden, was die genaue Aufzeichnung auch der schnellsten (schmalsten) chromatographischen Peaks gewährleistet. Gleichzeitig kann das Modul mit derselben Geschwindigkeit von 80 Hz auch vollständige Spektren an das Datensystem ausgeben.

In regulierten Labors ist es wichtig, dass alle Methodenparameter aufgezeichnet werden. Mit dem 1260 Infinity DAD können nicht nur die Gerätesollwerte aufgezeichnet werden, es sind darüber hinaus RFID-Tags (zur Identifizierung mit Hilfe elektromagnetischer Wellen) in die Lampe und die Flusszellenkartusche integriert, so dass die Identität und die Variablen dieser wichtigen Komponenten ebenfalls vom System aufgezeichnet werden können.

Schnellwechselventile der Serie 1200 Infinity

Die Agilent Schnellwechselventile 1200 Infinity sind für eine Vielzahl von anspruchsvollen Ventilanwendungen einsetzbar. Alle Ventilköpfe werden als komplettes Kit mit allen erforderlichen Kapillaren, zusätzlichen Wärmetauschern für geringe Dispersion und sonstigen Zubehörteilen geliefert.

Einige typische Anwendungen für Schnellwechselventile sind:

- Wahl zwischen zwei Säulen
- Probenanreicherung
- Probenaufreinigung
- Alternierende Säulenregeneration
- Spezielle Anwendungen wie Methodenentwicklung oder 2D-LC

Ausführliche Beschreibungen dieser Anwendungen finden Sie im Benutzerhandbuch für Ventillösungen.

Spezifikationen

Das modulare Design des Binären LC 1260 Infinity ermöglicht es Ihnen, ein System zu konfigurieren, das genau den Anforderungen Ihrer Anwendungen entspricht. Diese individuelle Konfiguration kann von der in diesem Systembenutzerhandbuch beschriebenen Standardkonfiguration abweichen.

Im Folgenden sind die technischen Daten und Leistungsdaten der Binären Pumpe 1260 Infinity angegeben. Informationen zu den Spezifikationen anderer Module in Ihrem System finden Sie in den jeweiligen Benutzerhandbüchern.

Technische Daten Binäre Pumpe 1260 Infinity (G1312B)

Tabelle 1 Technische Daten

Typ	Spezifikation	Anmerkungen
Gewicht	15,5 kg	
Abmessungen (Höhe × Breite × Tiefe)	180 x 345 x 435 mm	
Netzspannung	100 – 240 VAC, ± 10 %	weiter Bereich
Netzfrequenz	50 oder 60 Hz, ± 5 %	
Stromverbrauch	220 VA, 74 W / 253 BTU	Maximal
Umgebungstemperatur bei Betrieb	4–55 °C	
Umgebungstemperatur bei Nichtbetrieb	-40 – 70 °C	
Luftfeuchtigkeit	< 95 % rel. Feuchte bei 40 °C	nicht kondensierend
Betriebshöhe	Bis zu 2000 m	
Max. Höhe bei Nichtbetrieb	Bis zu 4600 m	Zur Aufbewahrung des Moduls
Sicherheitsstandards: IEC, CSA, UL	Installationskategorie II, Verschmutzungsgrad 2	Nur für den Einsatz im Innenbereich geeignet.

Leistungsspezifikationen

Tabelle 2 Leistungsdaten der Binären Pumpe Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Typ	Spezifikation	Anmerkungen
Hydrauliksystem	Zwei Pumpen mit jeweils zwei in Reihe angeordneten Kolben, servogesteuerter, variabler Kolbenhub, Kraftübertragung durch Gänge und Kugelspindeln, schwimmend gelagerte Kolben	
Einstellbarer Flussbereich	Sollwerte0,001 – 5 mL/min, in Schritten von 0,001 mL/min	
Flussbereich	0,05 – 5,0 mL/min	
Flussgenauigkeit	≤0,07 % RSD oder ≤0,02 min SD, je nachdem, was höher ist	basierend auf der Retentionszeit bei konstanter Raumtemperatur
Flussrichtigkeit	± 1 % oder 10 µL/min, je nachdem, was höher ist	beim Pumpen von entgastem H_2O bei 10 MPa (100 bar)
Betriebsdruckbereich	Betriebsbereich 0 – 60 MPa (0 – 600 bar, 0 – 8700 psi) bis zu 5 mL/min	
Druckschwankung	< 2 % Amplitude (typischerweise < 1,3 %) oder < 0,3 MPa (3 bar), je nachdem, was höher ist, mit 1 mL/min Isopropanol, bei jedem Druck > 1 MPa (10 bar, 147 psi) *Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen:* < 5 % Amplitude (typischerweise < 2 %)	
Kompressibilitätsausgleich	Voreingestellt, je nach Kompressibilität der mobilen Phase	
Empfohlener pH-Bereich	1,0 – 12,5 , Lösungsmittel mit einem pH-Wert < 2,3 dürfen keine Säuren enthalten, die Edelstahl angreifen	
Gradientenerzeugung	Binäre Hochdruckmischung	

Tabelle 2 Leistungsdaten der Binären Pumpe Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Typ	Spezifikation	Anmerkungen
Verzögerungsvolumen	*Konfiguration für das Standard-Verzögerungsvolumen:* 600 – 800 µL (einschließlich 400 µL Mischer), je nach Rückdruck *Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen:* 120 µL	gemessen mit Wasser bei 1 mL/min (Wasser-/Koffein-Tracer)
Bereich der Zusammensetzung	Einstellbarer Bereich: 0 – 100 % Empfohlener Bereich: 1 – 99 % oder 5 µL/min pro Kanal, je nachdem, was höher ist	
Genauigkeit der Zusammensetzung	< 0,15 % RSD oder < 0,04 min SD, je nachdem, was höher ist	bei 0,2 und 1 mL/min; basierend auf der Retentionszeit bei konstanter Raumtemperatur
Richtigkeit der Zusammensetzung	± 0,35 % absolut bei 2 mL/min, bei 10 MPa (100 bar)	(Wasser-/Koffein-Tracer)
Steuerung	Agilent Steuersoftware (z. B. ChemStation, EZChrom, OL, MassHunter)	
Lokale Steuerung	Agilent Instant Pilot	Version B.02.00 oder höher
Analogausgang	Zur Drucküberwachung, 1,33 mV/bar, ein Ausgang	
Datenübertragung	Controller-Area Network (CAN), RS-232C, APG-Remote: Signale Bereit, Start, Stopp und Shut-down, LAN optional	

Tabelle 2 Leistungsdaten der Binären Pumpe Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Typ	Spezifikation	Anmerkungen
Sicherheit und Wartung	Umfassende Unterstützung bei der Fehlerbehebung und Wartung bieten der Instant Pilot, der Agilent Lab Advisor und das Chromatographiedatensystem. Zu den sicherheitstechnischen Funktionen gehören die Leckagedetektion, die sichere Handhabung von Leckagen, bei Leckagen Signal zum Abschalten des Pumpensystems und geringe Spannungen in den wichtigsten Wartungsbereichen.	
GLP-Eigenschaften	Frühwarnsystem für fällige Wartungen (EMF, Early Maintenance Feedback) zur kontinuierlichen Verfolgung der Gerätenutzung hinsichtlich des Dichtungsverschleißes und der geförderten Menge mobiler Phase mit voreingestellten und frei einstellbaren Grenzwerten und Rückmeldung an den Benutzer. Elektronische Aufzeichnung der Wartung und Fehler	
Gehäuse	Alle Materialien sind wiederverwertbar	

HINWEIS

Für die Verwendung mit Durchflussraten unter 500 µl/min oder zur Verwendung ohne Dämpfer und Mischer ist ein Vakuumentgaser erforderlich.

Alle Spezifikationsmessungen erfolgen mit entgasten Lösungsmitteln.

2
Einführung

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie 28

Vorteile von Säulen mit kleiner Partikelgröße 34

Reibungserwärmung 37

Dieses Kapitel enthält eine Einführung zum Binären LC Agilent 1260 Infinity mit einer Vorstellung der zugrunde liegenden Konzepte.

Theorie der Verwendung kleinerer Partikel bei der Flüssigkeitschromatographie

Einführung

Im Jahr 2003 führte Agilent die ersten kommerziell erhältlichen, vollporösen Kieselgelsäulen mit 1,8 µm-Partikeln ein.

In Kombination mit dem Binären LC Agilent 1260 Infinity können die Sub-2-µm-Säulen (Partikelgröße 1,8 µm) eingesetzt werden, um zwei Hauptziele zu erreichen:

1 Schnellere Chromatographie

   Kurze Säulen mit Partikel unter 2 µm bieten die Möglichkeit, die Analysezeit durch Erhöhung der Flussrate drastisch zu verkürzen, ohne dabei Trennleistung einzubüßen.

2 Höhere Auflösung

   Lange Säulen mit einer Partikelgröße unter 2 µm bieten eine höhere Effizienz und somit eine höhere Auflösung, wie sie zur Trennung komplexer Proben erforderlich ist.

Der Druck, der erforderlich ist, um das Lösungsmittel durch eine Säule mit Sub-2-µm-Partikeln (STM) zu pressen, steigt rasch mit der Erhöhung der Flussrate, die zum Erreichen einer schnelleren Trennung erforderlich ist, und sehr rasch mit zunehmender Länge der Säule, die eine Voraussetzung für eine bessere Auflösung ist. Daher erfolgte die Einführung von STM-Säulen gleichzeitig mit der Entwicklung von UHPLC-Systemen. Diese HPLC-Systeme verwenden einen höheren Druck als die seit den frühen Tagen der HPLC gültige Norm von 400 bar.

Heute bietet Agilent den 1290 Infinity LC für höchste UHPLC-Anforderungen mit einem Druck von bis zu 1200 bar an.

Die Theorie

Die Effizienz der Trennung bei der HPLC kann durch die Van-Deemter-Gleichung (Abbildung 6 auf Seite 29) beschrieben werden. Diese leitet sich ab aus dem "Bodenhöhen"-Modell, das zur Bestimmung der Dispersion von Analyten auf ihrem Weg durch die Säule verwendet wird. H ist das Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens (auch als HETP, height equivalent to a theoretical plate, bezeichnet), d_p ist die Partikelgröße des Packungsmaterials der Säule, u_0 ist die lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase und A, B, und C sind Konstanten, die für die verschiedenen dispersiven Kräfte stehen. Der Term A bezieht sich auf die Eddy-Diffusion oder die unterschiedlichen Flusswege durch die Säule; B bezieht sich auf die Diffusion von Molekülen entlang der Säulenachse (longitudinale Diffusion); C bezieht sich auf den Massenübergang des Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase. Die Trennung ist umso effizienter, je kleiner H ist. Der Effekt jedes einzelnen Terms und die kombinierte Gleichung sind in Abbildung 6 auf Seite 29 dargestellt, in der die Bodenhöhe gegen die lineare Flussrate durch die Säule aufgetragen ist. Diese Art der Auftragung ist als Van-Deemter-Kurve bekannt und sie wird verwendet, um die optimale Flussrate (Minimum der Kurve) und damit die optimale Trennleistung einer Säule zu bestimmen.

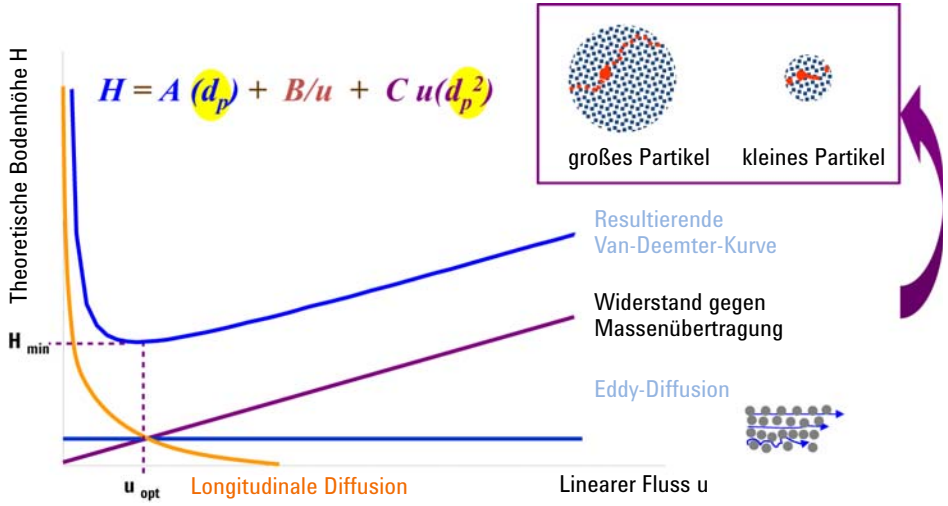


Abbildung 6 Hypothetische Van-Deemter-Kurve

Die Van-Deemter-Diagramme in Abbildung 7 auf Seite 30 zeigen, dass eine Verringerung der Partikelgröße zu höherer Effizienz führt. Die Umstellung von den häufig verwendeten Partikelgrößen 3,5 µm und 5,0 µm auf eine Partikelgröße von 1,8 µm ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Leistung. Die 1,8 µm-Partikel führen zu zwei- bis dreimal geringeren Werten für die Bodenhöhe und entsprechend höherer Effizienz. So kann eine kürzere Säule verwendet werden, ohne dass die Auflösung leidet. Außerdem verringert sich die Analysezeit um den Faktor zwei bis drei. Die Erhöhung der Effizienz ergibt sich vor allem aus der Verringerung der unterschiedlichen Flusswege infolge der kleineren Partikel. Dies führt zu einem kleineren A-Term (Eddy-Diffusion). Außerdem führen kleinere Partikel zu kürzeren Massenübergangszeiten, wodurch sich der C-Term verkleinert; die Folge ist ein deutlich geringerer Effizienzverlust mit steigender Flussrate (die Steigung der Kurve verringert sich). Das bedeutet, dass die Trennung an kleineren Partikeln durch Erhöhung der Flussrate weiter beschleunigt werden kann, ohne dass ein nennenswerter Effizienzverlust eintritt.

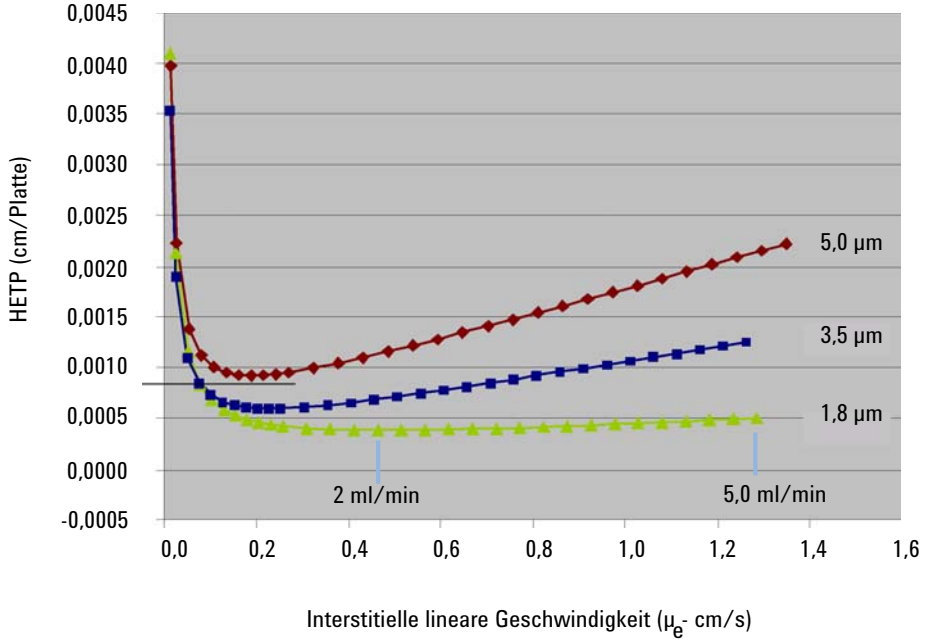


Abbildung 7 Van-Deemter-Kurve für unterschiedliche Partikelgrößen

Eine chromatographische Trennung kann auf der Grundlage der physikalischen Parameter der HPLC-Säule optimiert werden, wie beispielsweise Partikelgröße, Porengröße, Partikelmorphologie, Länge und Durchmesser der Säule, Lösungsmittelgeschwindigkeit und Temperatur. Darüber hinaus kann die Thermodynamik einer Trennung berücksichtigt werden, und die Eigenschaften des gelösten Stoffs sowie der stationären und mobilen Phase (Prozentsatz des organischen Lösungsmittels, Ionenstärke und pH-Wert) können manipuliert werden, um eine möglichst kurze Retention und höchste Selektivität zu erreichen.

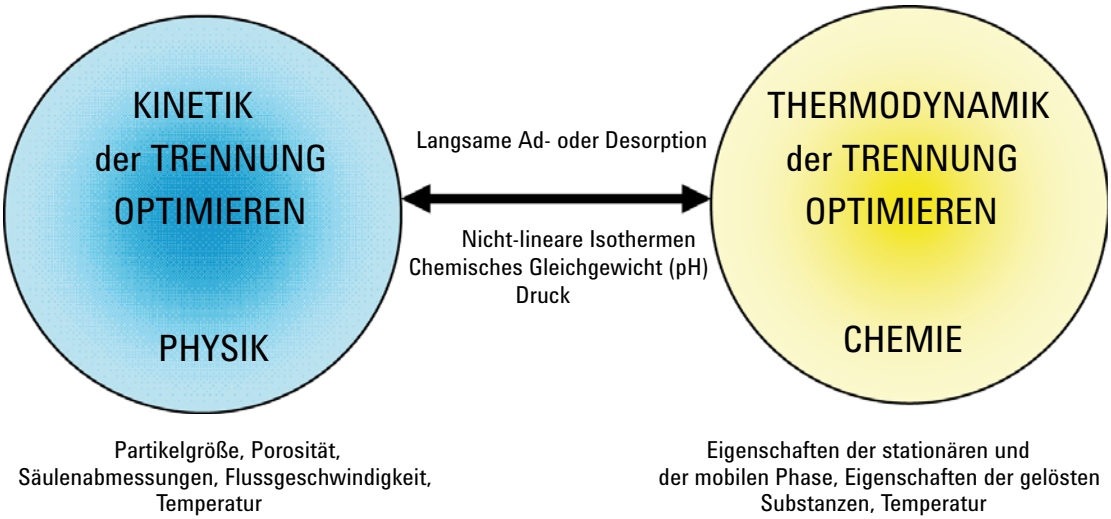


Abbildung 8 Ermittlung optimaler Bedingungen bei der HPLC

Die Auflösung kann als Funktion von drei Parametern beschrieben werden:

- Säuleneffizienz oder theoretische Böden (N),
- Selektivität (α),
- Retentionsfaktor (k).

Gemäß der Auflösungsgleichung (Abbildung 9 auf Seite 32) hat die Selektivität den stärksten Einfluss auf die Auflösung (Abbildung 10 auf Seite 32). Dies bedeutet, dass die Auswahl geeigneter Eigenschaften der mobilen und stationären Phase sowie der richtigen Temperatur für eine erfolgreiche Trennung entscheidend ist.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right] \cdot \left[\frac{k_2'}{k_2' + 1}\right]$$

Abbildung 9 Auflösungsgleichung

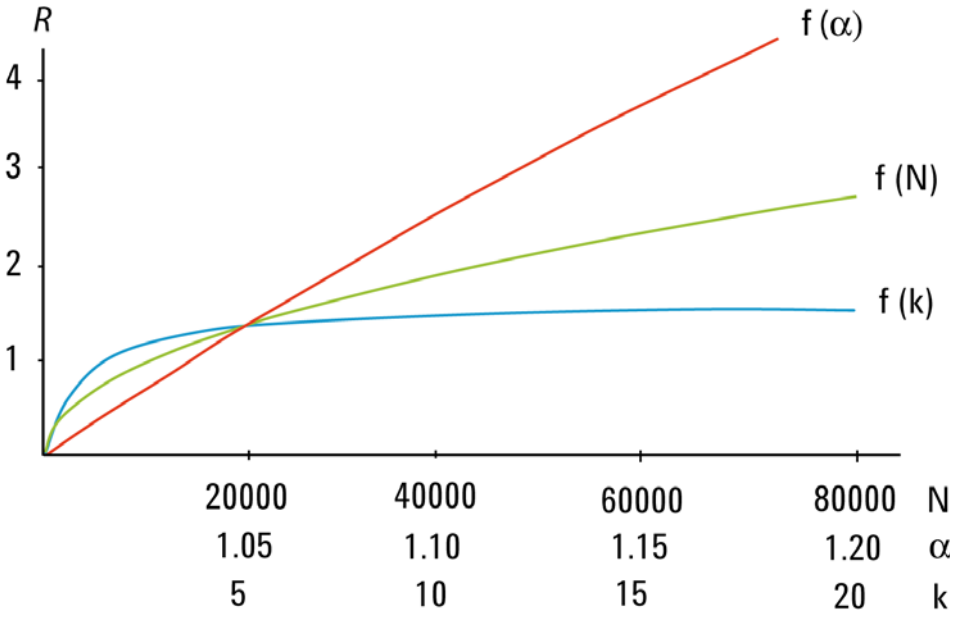


Abbildung 10 Einfluss der Anzahl an Böden, des Trennfaktors und des Retentionsfaktors auf R

Unabhängig davon, ob die UHPLC-Trennmethode neu entwickelt oder eine vorhandene konventionelle Methode einfach transferiert wird - es ist sicherlich

von Vorteil, eine große Auswahl an stationären Phasen mit unterschiedlicher Zusammensetzung und in unterschiedlichen Säulenformaten zur Verfügung zu haben.

Agilent bietet mehr als 140 ZORBAX 1,8 µm-RRHT-Säulen (Rapid Resolution High Throughput - Geschwindigkeit, Auflösung, hoher Durchsatz) in 14 Selektivitätsoptionen, 15 bis 150 mm lang, mit einem Innendurchmesser von 2,1 , 3,0 und 4,6 mm.

Zusätzlich zu den ZORBAX-Säulen sind PoroShell-Säulen mit neun verschiedenen Selektivitätsoptionen zur Verwendung mit dem Binären LC Agilent 1260 Infinity erhältlich.

So kann die optimale stationäre Phase ausgewählt werden, die zur Maximierung der Selektivität erforderlich ist. Auflösung, Flussrate und Analysendauer können durch Auswahl der geeigneten Säulenlänge bzw. des geeigneten Säulendurchmessers optimiert werden und der Einsatz längerer Sub-2-µm-Säulen ist mittlerweile so einfach wie nie zuvor.

Bei PoroShell-Säulen handelt es sich um Säulen mit teilporösen Partikeln (SPP, superficially porous particle). Im Gegensatz zu Säulen mit vollporösen Kieselgelpartikeln haben die Partikel in diesen SPP-Säulen einen undurchlässigen Kern mit einem Durchmesser von 1,7 µm, der von einer 0,5 µm dicken, porösen Kieselgelschicht umhüllt ist. Bezüglich der Geschwindigkeit und der Auflösung sind PoroShell-Säulen mit Sub-2-µm-Säulen vergleichbar - bei einem um bis zu 50 % niedrigeren Rückdruck. PoroShell-Säulen mit ihrer kleineren Partikelgröße haben die älteren Säulen mit 'Kern-Schalen-Partikeln' an Bedeutung überholt. Das aktuelle Interesse an dieser Technik basiert auf der Einführung von kleineren Partikelgrößen, beispielsweise unter 3 µm, zur Verwendung in typischen Umkehrphasentrennungen kleiner Moleküle.

Viele Labors ermitteln die beste Kombination aus stationärer Phase, mobiler Phase und Temperatur für ihre Trennungen in einem umfassenden Screening-Prozess. Die Agilent Serie 1200 Infinity bietet eine Lösung für die Multimethodenentwicklung an. Diese ermöglicht die vollständige Automatisierung dieses zeitaufwendigen Auswahlprozesses und macht so die Entwicklung und den Transfer von Methoden einfacher und zuverlässiger.

ZORBAX 1,8 µm RRHT-Säulen haben dieselbe Zusammensetzung wie ZORBAX Säulen mit einer Partikelgröße von 3,5 und 5 µm. Infolge dessen bieten Partikel der Größen 5,0 , 3,5 und 1,8 µm bei jeder beliebigen ZORBAX-Phase dieselbe Selektivität. Dies ermöglicht einen einfachen, schnellen und sicheren bidirektionalen Methodentransfer zwischen konventioneller LC und UHPLC.

Vorteile von Säulen mit kleiner Partikelgröße

Schnellere Chromatographie

Kürzere Laufzeiten haben eine Reihe von Vorteilen. Labors mit hohem Durchsatz verfügen über eine höhere Kapazität und können mehr Proben in kürzerer Zeit analysieren. Die Analyse von mehr Proben in kürzerer Zeit verringert zudem die Kosten. Beispielsweise senkt eine Verkürzung der Analysezeit von 20 min pro Probe auf 5 min die Kosten für 700 Proben um 79 % (Tabelle 3 auf Seite 34).

Tabelle 3 Zeit- und Kosteneinsparungen bei 700 Analysen

Zykluszeit	Zykluszeit 20 min	Zykluszeit 5 min
Läufe	700	700
Ungef. Kosten/Analyse[1]	10,58 $	2,24 $
Ungef. Kosten/700 Analysen[1]	7400 $	1570 $
Kosteneinsparungen	-	5830 $
Zeit[2]	10 Tage	2,5 Tage

1 Lösungsmittel: 27 $/l, Entsorgung: 2 $/l, Labor: 30 $/h

2 24 Stunden/Tag

Mit dem Agilent Kosteneinsparungsrechner können die Einsparungen bei der Umstellung von der konventionellen HPLC auf die UHPLC unter Verwendung von Säulen mit einer Partikelgröße von 1,8 µm auf einfache Weise berechnet werden. Diesen Rechner finden Sie auf der Website von Agilent Technologies zusammen mit einem Methodentransferrechner: www.chem.agilent.com. Die Ergebnisse werden grafisch und in einer Tabelle dargestellt.

Kürzere Laufzeiten führen auch schneller zu Ergebnissen. Dies ist wichtig bei der Prozesskontrolle und für schnelle Freigabetests. Statt Stunden auf die Freigabe einer einzelnen Medikamentencharge warten zu müssen, können nun die Anpassung und Kalibrierung des Systems sowie die Probenanalyse in weniger als einer Stunde durchgeführt werden. Schnelle Ergebnisse sind darü-

ber hinaus wichtig für Synthesechemiker, die offene LC/MS-Systeme zur Überprüfung von Verbindungen und zur Reaktionskontrolle verwenden. Schließlich können kürzere Laufzeiten die Methodenentwicklung erheblich beschleunigen.

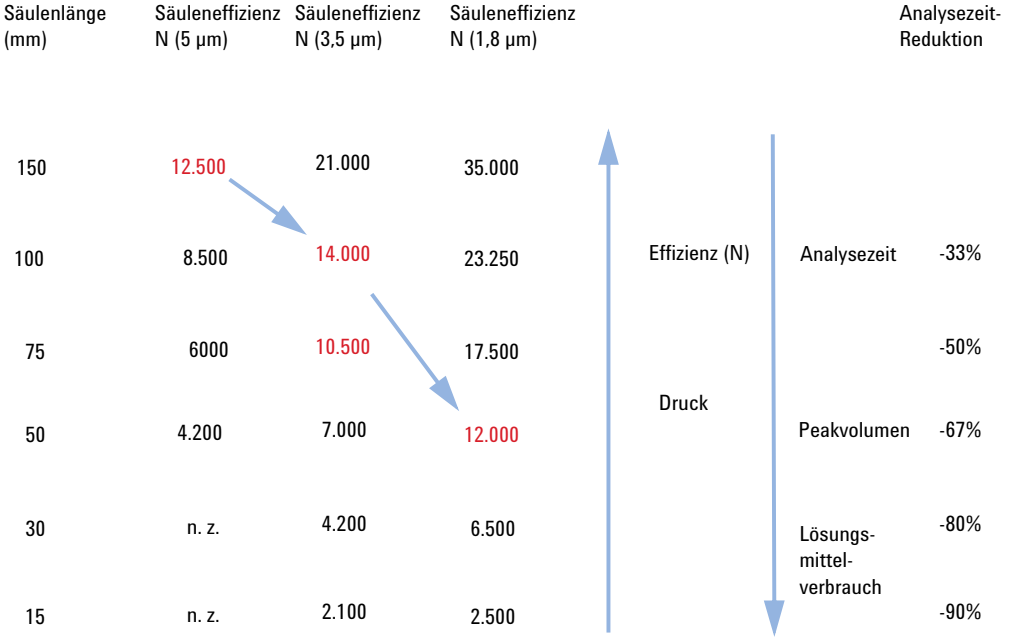


Abbildung 11 Zusammenhang zwischen Partikelgröße, Effizienz und Analysezeit

Durch die Optimierung der Partikelgröße und des Drucks kann die Analysendauer ohne Einbußen bei der Säuleneffizienz verkürzt werden.

Höhere Auflösung

Längere Säulen, die mit kleineren Partikeln gepackt sind, führen zu höherer Effizienz und besserer Auflösung. Dies ist wichtig bei der Analyse komplexer Proben aus Metabolom- oder Proteom-Studien. Auch Anwendungen wie die Erstellung von Verunreinigungsprofilen können von einer höheren Trennleistung profitieren. Sogar für die LC/MS-Analyse von Medikamenten oder Drogen in biologischen Flüssigkeiten ist eine höhere Peak-Kapazität aufgrund der reduzierten Interferenz durch Ionenunterdrückung von Vorteil. Generell führt eine höhere Trennleistung zu verlässlicheren Analyseergebnissen.

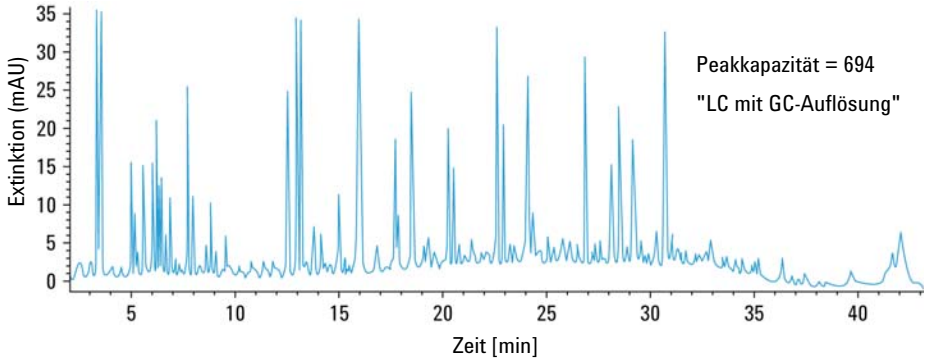


Abbildung 12 Bei Verwendung einer ZORBAX RRHT SB-C18 Säule (2,1 x 150 mm, 1,8 µm) zur Analyse eines tryptischen Verdaus von BSA können Peakkapazitäten von mehr als 700 erreicht werden.

Reibungserwärmung

Das Durchleiten der mobilen Phase durch die Säule unter höherem Druck und höheren Flussraten erzeugt Wärme. Die entstehenden Temperaturgradienten (radial und longitudinal) können sich auf die Säuleneffizienz auswirken.

$$Power = F * p$$

wobei F für die Flussrate und p für den Druck steht.

Eine intensive Thermostatisierung der Säule (beispielsweise mit einem Wasserbad) führt zu einem starken radialen Temperaturgradienten, der wiederum einen deutlichen Verlust an Säuleneffizienz verursacht. Thermostatisierung durch stehende Luft reduziert den radialen Temperaturgradienten und verringert so den Effizienzverlust, es muss jedoch eine höhere Säulenauslasstemperatur in Kauf genommen werden. Die höhere Temperatur kann die Selektivität beeinflussen. Bei geringerem Rückdruck können Leistungsverluste durch Reibungswärme auf ein Minimum begrenzt werden, so dass Sub-2-µm-Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 oder 3 mm immer noch effizienter sind als vergleichbare Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung von Packungsmaterial aus Partikeln unter 2 µm die Vorteile höherer Effizienz, höherer Auflösung und schnellerer Trennung bietet.

Die Funktionen des Binären LCs Agilent 1260 Infinity werden im Kapitel *Gerätebeschreibung* erläutert. Im Kapitel *Optimierung* lesen Sie, wie Sie durch Nutzung dieser Funktionen und Anwendung der Theorie optimierte Trennmethoden entwickeln können.

3 Optimierung des Agilent 1260 Infinity Binary LC

Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens 40
Verzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen 40
Verzögerungsvolumina im Agilent 1260 Infinity Binary LC 42
Optimale Gerätekonfiguration für Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm 43
Optimale Gerätekonfiguration für Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 und 4,6 mm . 45
Erzielen höherer Injektionsvolumina 47
Erzielen kürzerer Zykluszeiten 49
Erzielen eines höheren Durchsatzes 52
Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung 53
Erzielen einer höheren Auflösung 55
Optimale Gerätekonfiguration für hohe Auflösung 58
Erzielen einer höheren Empfindlichkeit 63
Optimale Gerätekonfiguration für hohe Empfindlichkeit 64
Wahl einer Flusszelle 66
Verstopfung von Säulen vermeiden 68

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die Theorie anzuwenden ist und wie die Funktionen des LC-Systems zur Entwicklung optimierter Trennmethoden genutzt werden können.

Konfiguration des optimalen Verzögerungsvolumens

Verzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen

Das *Totvolumen*, oder Verzögerungsvolumen, ist definiert als das Systemvolumen zwischen dem Mischpunkt in der Pumpe und dem Säulenkopf.

Das *Extrasäulenvolumen* ist definiert als das Volumen zwischen dem Injektionspunkt und dem Nachweispunkt, abzüglich des Volumens in der Säule.

Verzögerungsvolumen

Bei Gradiententrennungen verursacht dieses Volumen eine Verzögerung zwischen der Änderung der Mischung in der Pumpe und dem Zeitpunkt, zu dem diese Änderung die Säule erreicht. Die Verzögerung hängt von der Durchflussrate und dem Verzögerungsvolumen des Systems ab. Dies bedeutet, dass sich in jedem HPLC-System zu Beginn jedes Analysenlaufs ein zusätzliches isokratisches Segment im Gradientenprofil befindet. In der Regel wird das Gradientenprofil in Form der Mischungseinstellungen an der Pumpe angegeben und das Verzögerungsvolumen wird nicht spezifiziert, obwohl sich dies auf die Chromatographie auswirkt. Diese Auswirkungen machen sich bei niedrigen Flussraten und kleinen Säulenvolumina stärker bemerkbar und können die Übertragbarkeit von Gradientenmethoden stark beeinflussen. Es ist daher wichtig, bei schnellen Gradiententrennungen kleine Verzögerungsvolumina zu haben, insbesondere bei Narrowbore-Säulen (d. h. mit einem ID von 2,1 mm), die häufig in der massenspektrometrischen Detektion verwendet werden.

Als Beispiel: Bei HPLC-Methoden mit 5 µm Packungsmaterial werden in der Regel Durchflussraten von 1 ml/min in Säulen mit einem 4,6 mm ID 0,2 ml/min und in Säulen mit einer 2,1 mm ID verwendet (dieselbe lineare Geschwindigkeit in der Säule). Bei einem System mit einem typischen Verzögerungsvolumen von 1000 µl und einer 2,1 mm-Säule gäbe es ein anfängliches "verborgenes" isokratisches Segment von 5 min. Bei einem System mit einem Verzögerungsvolumen von 600 µl würde die Verzögerung dagegen 3 min betragen. Diese Verzögerungsvolumina wären für eine Analysendauer von ein oder zwei Minuten zu hoch. Werden Sub-2-µm-Partikel als Packungsmaterial verwendet, ist die optimale Flussrate (gemäß der Van-Deemter-Kurve) etwas höher, so dass bei der schnellen Chromatographie das Drei- bis Fünffache dieser Flussraten verwendet werden kann und damit Verzögerungszeiten von

etwa einer Minute erreicht werden. Das Verzögerungsvolumen muss jedoch noch weiter reduziert werden, um Verzögerungszeiten zu erzielen, die nur einen Bruchteil der geplanten Analysendauer ausmachen. Dies wird beim Binären LC Agilent 1260 Infinity durch das niedrige Verzögerungsvolumen des Pumpenflusswegs und das geringe Volumen des Flusswegs durch den Probengeber erreicht.

Extrasäulenvolumen

Das Extrasäulenvolumen ist eine Quelle für Peakdispersion, die zu einer Verringerung der Auflösung bei der Trennung führt. Es sollte daher minimiert werden. Säulen mit kleinerem Durchmesser erfordern ein proportional kleineres Extrasäulenvolumen, um die Peakdispersion auf ein Minimum zu reduzieren.

In einem Flüssigkeitschromatographen wird das Extrasäulenvolumen durch die Verbindungsschläuche zwischen dem automatischen Probengeber, der Säule und dem Detektor sowie durch das Volumen der Flusszelle im Detektor bestimmt. Das Extrasäulenvolumen wird beim Binären LC Agilent 1260 Infinity durch die Narrow-Bore-Leitung (Innendurchmesser 0,12 mm), die Niedervolumen-Wärmetauscher im Säulenthermostat und die Max-Light-Kartuschenzelle im Detektor minimiert.

Verzögerungsvolumina im Agilent 1260 Infinity Binary LC

Tabelle 4 auf Seite 42 und Tabelle 5 auf Seite 42 zeigen die Komponentenvolumina, die zum System-Verzögerungsvolumen im binären LC-System Agilent 1260 Infinity beitragen.

Tabelle 4 Verzögerungsvolumina der Module des Binären LCs 1260 Infinity

Komponenten	Verzögerungsvolumen (µl)
Binäre Pumpe[1]	120
Binäre Pumpe[2]	600 – 800
Mischer für geringes Volumen	200
Mischer	400
Automatischer Probengeber	270
Wärmetauscher für geringe Dispersion	1,6
Integrierter Wärmetauscher	3 und 6

[1] in Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen mit umgangenem Dämpfer und Mischer

[2] in Konfiguration für Standard-Verzögerungsvolumen

Tabelle 5 Verzögerungsvolumina der Konfigurationen für den Binären LC 1260 Infinity

Systemkonfiguration	Verzögerungsvolumen (µl)
Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen	Pumpe: 120 Automatischer Probengeber:
Konfiguration für mittleres Verzögerungsvolumen	Pumpe: 320
Konfiguration für Standard-Verzögerungsvolumen	Pumpe: 600 – 800

Es existieren zwei Möglichkeiten, um zwischen den Konfigurationen zu wechseln:

- manuell durch Trennen und erneutes Verbinden der Kapillaren
- automatisch durch Verwendung eines 600 bar 2PS/6PT-Ventils (optional)

Optimale Gerätekonfiguration für Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm

Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen zum Erzielen der kleinsten Gradientenverzögerung für ultraschnelle Gradiententrennungen

In der Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen werden der Dämpfer und der Mischer der Binären Pumpe Agilent 1260 Infinity umgangen, wodurch das Verzögerungsvolumen der Pumpe auf etwa 120 µL verringert wird. Abbildung 13 auf Seite 43zeigt die Verbindungen für den Flussweg in dieser Konfiguration. Auf diese Weise wird die kleinste Gradientenverzögerung für ultraschnelle Gradiententrennungen erzielt. Um die elektronische Dämpfungssteuerung, welche die physische Volumendämpfung ersetzt, in vollem Umfang auszunutzen, ist es wichtig, im Hilfebildschirm des Pumpenmenüs jeweils die Funktion **Enhanced Solvent Compressibility** auszuwählen.

Zur Minimierung der Peakdispersion muss das Kit für geringe Dispersion (Geringes Dispersionskit (G1316-68744)) installiert werden. Dieses Kit enthält kurze Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,12 mm und Wärmetauscher für geringe Dispersion (1,6 µL und 1,5 µL) für den Säulenthermostaten. Um die Auflösung im UV-Detektor beizubehalten, sollte eine Flusszelle mit geringem Volumen verwendet werden. Empfehlungen zur Flusszelle finden Sie unter "Wahl einer Flusszelle" auf Seite 66.

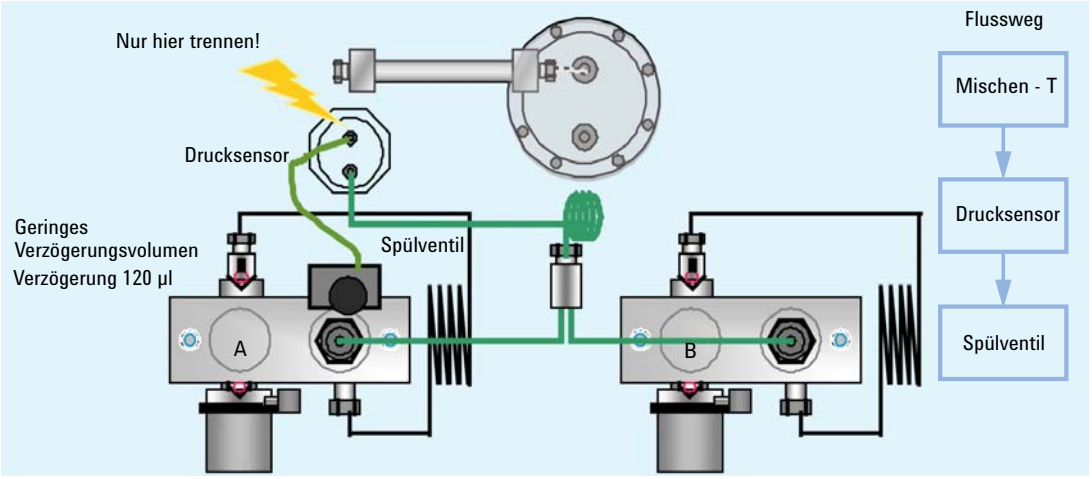


Abbildung 13 Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen für Säulen mit einem ID von 2,1 mm

Vergessen Sie nicht, im Hilfebildschirm des Pumpenmenüs den richtigen Parameter einzustellen. Dies stellt sicher, dass immer die korrekten Kompressibilitätswerte für die verwendeten mobilen Phasen angewendet werden. Für die meisten gebräuchlichen Lösungsmittel sind Kalibrierungskurven verfügbar.

Konfiguration für mittleres Verzögerungsvolumen zum Erzielen der höchsten UV-Empfindlichkeit

Für UV-Anwendungen mit hoher Empfindlichkeit kann ein zusätzlicher 200 µL-Mischer (Mischer für niedriges Volumen (200 µL) (5067-1565)) installiert werden, um ein eventuell noch vorhandenes mischerbedingtes Rauschen zu verringern. Dieser kleine Mischer sorgt selbst unter extremen Gradientenbedingungen für ein minimales UV-Basislinienrauschen. Siehe Abbildung 14 auf Seite 44.

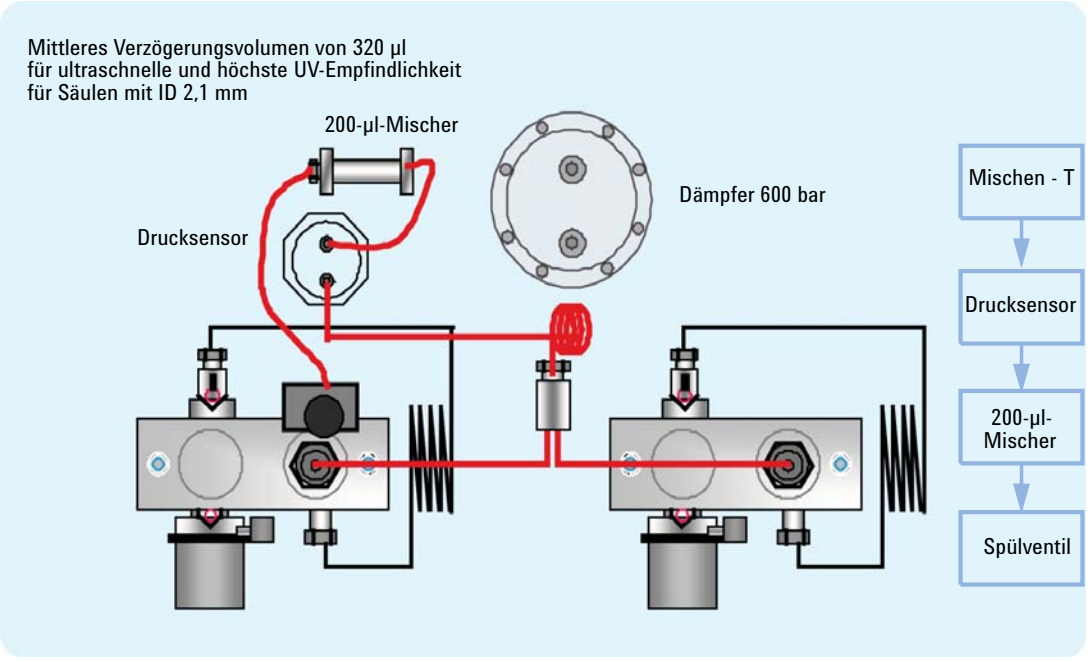


Abbildung 14 Konfiguration für mittleres Verzögerungsvolumen für Säulen mit einem ID von 2,1 mm mit höchster UV-Empfindlichkeit

Optimale Gerätekonfiguration für Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 und 4,6 mm .

Standardkonfiguration für das Verzögerungsvolumen für höchste UV-Empfindlichkeit und direkte Übertragbarkeit von Methoden

Die relativen Säulenvolumina für Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 mm und 4,6 mm sind etwa zwei- bzw. fünfmal so groß wie für Säulen in der gleichen Länge mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm und die verwendeten Flussraten sind ebenfalls proportional höher. Deshalb resultiert das Standard-Verzögerungsvolumen der binären Pumpen nicht in einer signifikant höheren Gradientenverzögerung.

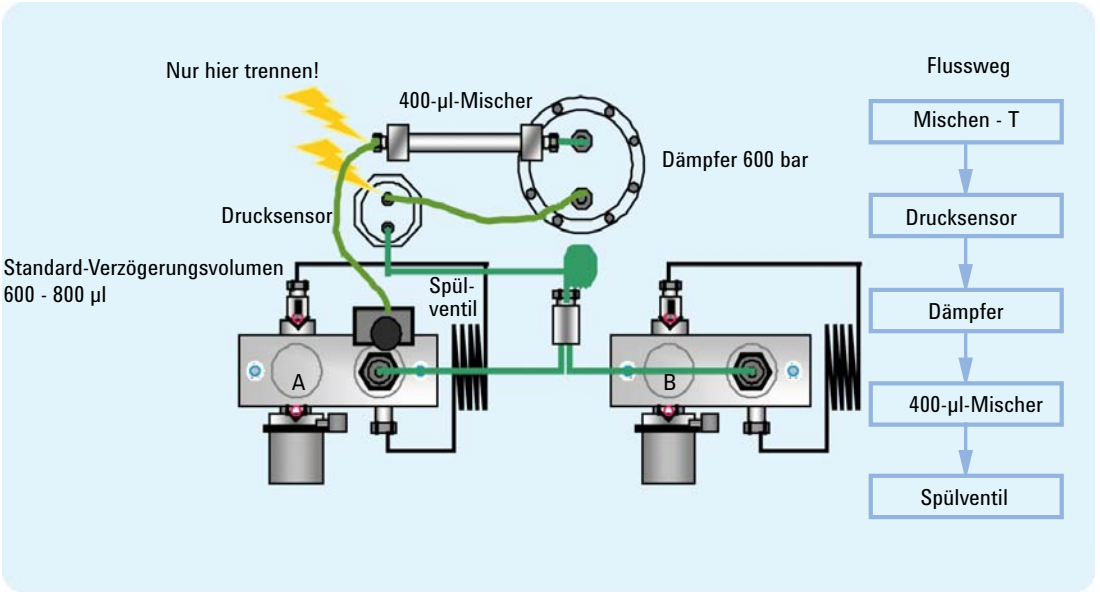


Abbildung 15 Konfiguration für Standard-Verzögerungsvolumen für Säulen mit einem ID von 3 und 4,6 mm mit höchster UV-Empfindlichkeit

Die Konfiguration für das Standard-Verzögerungsvolumen ist auch die Konfiguration, die einen direkten Methodentransfer vom LC-System der Serien 1100 und 1200 zum Binären LC 1260 Infinity und umgekehrt ermöglicht. In Abbildung 16 auf Seite 46 sind zwei Chromatogramme einer Methode zur Analyse von Paracetamol und Verunreinigungen übereinander angeordnet. Die Methode wurde von einem Agilent LC-System der Serie 1200 auf einen Binären LC Agilent 1260 Infinity übertragen, wobei die Chromatographiebedingungen (Säule, mobile Phase, Pumpeneinstellungen, Injektionsvolumen, Säulentemperatur, Detektoreinstellungen) unverändert blieben. Dies zeigt, dass ein nahtloser Methodentransfer möglich ist.

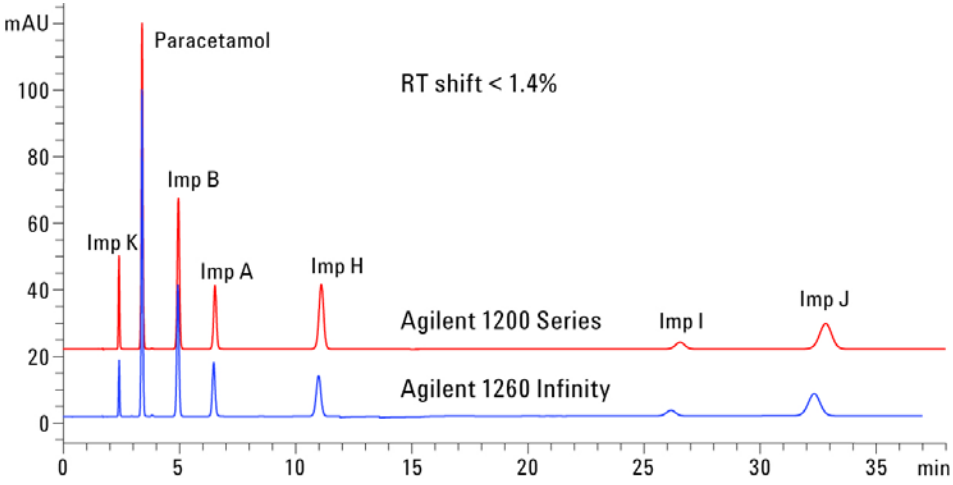


Abbildung 16 Vergleich des Agilent LC-Systems der Serie 1200 und des Agilent LC-Systems 1260 Infinity für eine Konfiguration

Erzielen höherer Injektionsvolumina

Die Standardkonfiguration des automatischen Probengebers Agilent 1260 Infinity kann ein Maximalvolumen von 100 µL mit der Standardschleifenkapillare injizieren. Um das Injektionsvolumen zu erhöhen, kann das Multi-Draw-Aktualisierungskit (G1313-68711)installiert werden. Mit dem Kit können Sie maximal 400 µL oder 1400 µL zum Injektionsvolumen Ihres Injektors hinzufügen. Das Gesamtvolumen beträgt dann 500 µL oder 1500 µL für den automatischen Probengeber 1260 Infinity mit analytischem 100 µL-Dosierkopf. Beachten Sie, dass das Verzögerungsvolumen Ihres automatischen Probengebers vergrößert wird, wenn Sie die verlängerten Injektorkapillaren aus dem Multi-Draw-Kit verwenden. Bei der Kalkulation des Verzögerungsvolumens des Probengebers, müssen Sie das Volumen der verlängerten Kapillaren verdoppeln. Das Verzögerungsvolumen des Systems nimmt aufgrund des automatischen Probengebers entsprechend zu.

Wenn eine Methode von einer größeren Säule auf eine kleinere Säule herunterskaliert wird, ist es wichtig, dass die Methodenumwandlung einen Spielraum zur Reduzierung des Injektionsvolumens im Verhältnis zum Säulenvolumen lässt, um die Leistungsfähigkeit der Methode aufrechtzuerhalten. Ziel hierbei ist es, das Volumen der Injektion prozentual bezogen auf die Säule im selben Verhältnis zu halten. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn das zu injizierende Lösungsmittel stärker (mehr eluotrop) als die mobile Startphase ist und eine Erhöhung die Trennung insbesondere bei frühen Peaks (geringer Retentionsfaktor) beeinflusst. In einigen Fällen ist dies die Ursache für Peakverzerrungen. Im Allgemeinen sollte das Injektionslösungsmittel gleich stark wie die anfängliche Gradientenzusammensetzung oder schwächer sein. Dies hat Auswirkungen darauf, ob oder um wie viel das Injektionsvolumen erhöht werden kann. Der Benutzer sollte beim Versuch, das Injektionsvolumen zu vergrößern, auf Anzeichen einer erhöhten Dispersion achten (breitere oder schiefere Peaks und eine reduzierte Peakauflösung). Wenn eine Injektion in einem schwachen Lösungsmittel erfolgt, kann das Volumen möglicherweise weiter erhöht werden, da dies dazu führt, dass die Substanz zu Beginn des Gradienten auf dem Säulenkopf konzentriert wird. Wenn hingegen die Injektion in einem stärkeren Lösungsmittel als die anfängliche mobile Phase erfolgt, führt das erhöhte Injektionsvolumen zu einer Verteilung der Substanzbande entlang der Säule vor dem Gradienten, was zu Peakdispersion und Auflösungsverlust führt.

Der Hauptfaktor bei der Ermittlung des Injektionsvolumens ist möglicherweise der Durchmesser der Säule, da dieser einen großen Einfluss auf die Peakdispersion hat. Peakhöhen können bei einer schmaleren Säule höher sein als bei einer größeren Injektionsmenge und einer breiteren Säule, da hier die Peakdispersion geringer ausfällt. Bei Säulen mit einem ID von 2,1 mm liegen die typischen Injektionsvolumina zwischen 5 und 10 µl, hängen jedoch stark von der chemischen Zusammensetzung des Analyten und der mobilen Phase ab, wie oben beschrieben. In einer Gradiententrennung können Injektionsvolumina von etwa 5 % des Säulenvolumens erzielt werden, ohne die Auflösung oder Peakdispersion zu beeinträchtigen.

Erzielen kürzerer Zykluszeiten

Kürzere Zykluszeiten können durch die Wahl einer kurzen Säule mit guter Selektivität erreicht werden. Die Abmessungen der Säule werden auch durch das verwendete Detektorsystem bestimmt. Für die UV-Detektion sind Säulen mit einem Innendurchmesser von 3,0 mm ideal, da mit ihnen die höchste lineare Geschwindigkeit erzielt werden kann. Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm liefern ebenfalls hohe lineare Geschwindigkeiten, aber die maximale Flussrate ist auf 5 mL/min beschränkt.

Die Pumpe sollte in der Standardkonfiguration für das Verzögerungsvolumen (siehe Abbildung 13 auf Seite 43) verwendet werden, wenn Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm und 3,0 mm benutzt werden. Für Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm sollte die Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen verwendet werden. Bei der Verwendung von Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm sollte außerdem das Kit für geringe Dispersion installiert werden, um das Extrasäulenvolumen zu minimieren. Es wird empfohlen, für höchste UV-Empfindlichkeit zusätzlich den kurzen Mischer (Mischer für niedriges Volumen (200 µL) (5067-1565)) zu verwenden.

Die Chromatographiebedingungen hängen in erster Linie von den zu analysierenden Substanzen ab. Durch die Beachtung einiger Faustregeln kann jedoch eine kurze Laufzeit erzielt werden:

- Die Flussraten sollten möglichst hoch gewählt werden, abhängig von der erforderlichen Auflösung, dem Rückdruck und dem verwendeten Detektorsystem.
- Verwenden Sie steile Gradienten.
- Es werden hohe Säulentemperaturen empfohlen, um die Verwendung hoher Flussraten zu ermöglichen und um die Laufzeit weiter zu verkürzen. Zorbax SB Säulen können bei Temperaturen bis zu 90 °C bei niedrigen pH-Werten verwendet werden.

Alternierende Säulenregeneration

Sie können noch kürzere Zykluszeiten erzielen, wenn Sie ein Säulenregenerationsventil in Kombination mit einer Regenerationspumpe verwenden. In dieser Konstellation findet die Regeneration der zuvor verwendeten Säule statt, während eine Analyse auf der zweiten Säule läuft. Dadurch wird die Zykluszeit erheblich verkürzt.

Bei der Verwendung von zwei Säulen, zwei Pumpen und einem Ventil mit 2 Positionen/10 Anschlüssen kann zwischen diesen Säulen umgeschaltet werden, um von Injektion zu Injektion die kürzesten Zykluszeiten zu erzielen. Säulen mit der gleichen Zusammensetzung und der gleichen Charge bieten typischerweise eine Präzision der Retentionszeit, die eine Datenauswertung mit der gleichen Kalibriertabelle ermöglicht.

Eine ausführlichere Beschreibung der alternierenden Säulenregeneration finden Sie im Benutzerhandbuch für Ventillösungen.

Automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens (ADVR)

Der Agilent Hochleistungsprobengeber 1260 Infinity bietet die Möglichkeit, überlappende Injektionen (OI) und/oder eine automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens (ADVR) durchzuführen. Dies bedeutet, dass das Injektionsventil aus dem Flussweg entfernt wird, nachdem die Probe den Säulenkopf erreicht hat. Dadurch wird das Verzögerungsvolumen erheblich verringert, siehe Abbildung 17 auf Seite 51.

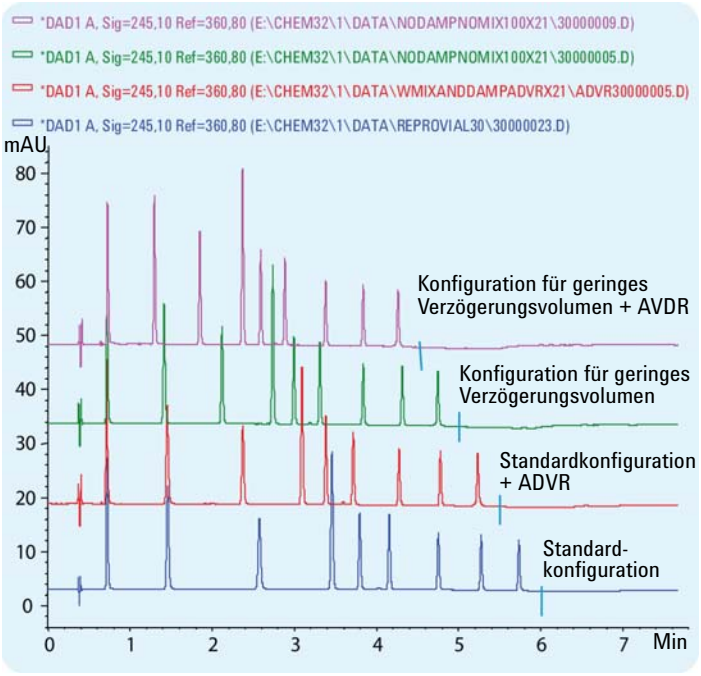


Abbildung 17 Reduktion des Verzögerungsvolumens

Je kleiner die Flussrate ist, desto größer ist der zu erwartende negative Einfluss des Verzögerungsvolumens. In Abbildung 17 auf Seite 51 wurde eine Säule mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm bei einer Flussrate von 0,6 mL/min verwendet. Vom untersten Diagramm bis zum obersten Diagramm wurde das Verzögerungsvolumen schrittweise verringert. Der Einfluss auf die Gesamtlaufzeit und die Einwirkung, insbesondere auf die Peakbreite und die Höhe der ersten Peaks, ist deutlich zu erkennen.

Es ist ein Nachteil der überlappenden Injektion und der automatischen Reduktion des Verzögerungsvolumens, dass sich der Probengeber nicht während der

gesamten Laufzeit im Flussweg befindet. Bei stark haftenden Substanzen kann dies zu einer stärkeren Verschleppung und/oder Diskriminierung von Substanzen führen.

Unter Verschleppung versteht man den Prozentsatz der Substanz, der in den Geräteteilen mit Probenkontakt zurückbleibt und nicht zur Analyse auf die Säule gespült wird. Dies bedeutet auch, dass dieser Prozentsatz nicht für die quantitative Messung zur Verfügung steht; er ist diskriminiert. Man kann die Verschleppung durch Injizieren eines reinen Lösungsmittels nach Beendigung des Probenlaufs messen. Diskriminierung und Verschleppung können noch an Bedeutung gewinnen, wenn die zu analysierenden Substanzen unpolar sind und der Gradient zu Beginn einen hohen Prozentsatz an Wasser aufweist. Im ungünstigsten Fall fällt die unpolare Substanz an der Kontaktoberfläche aus. Ein kleines Volumen einer Substanz wie Dimethylsulfoxid vor und nach dem Probenvolumen kann helfen, dieses Problem zu minimieren.

Für eine überlappende Injektion oder automatisierte Reduktion des Verzögerungsvolumens sollte die Zeitspanne vor dem Umschalten des Injektionsventils in den Nebenflussmodus verlängert werden, indem der Ausspülfaktor auf 20 erhöht wird. Dadurch wird das Verzögerungsvolumen des Probengebers während einer längeren Zeitspanne mit der mobilen Phase gespült.

Erzielen eines höheren Durchsatzes

Die Injektion kann bezogen auf die Geschwindigkeit optimiert werden, wobei zu beachten ist, dass ein zu schnelles Ansaugen der Probe die Reproduzierbarkeit vermindern kann. Hier lassen sich aber nur marginale Verbesserungen erzielen, da die Probenvolumina in jedem Fall zum niedrigeren Ende des Bereichs tendieren. Ein beträchtlicher Anteil der Injektionszeit wird von den Nadelbewegungen in die und aus der Probenflasche und in den Spülanschluss in Anspruch genommen. Diese Vorgänge lassen sich durchführen, während die vorhergehende Trennung läuft. Man bezeichnet dies als "überlappende Injektion". Sie kann auf dem Probengeber über den Setup-Bildschirm in der Steuerungssoftware aktiviert werden. Der Probengeber kann so eingerichtet werden, dass der Fluss durch den Probengeber nach der Injektion auf Nebenfluss umgeschaltet wird. Danach, beispielsweise nach 3 Minuten, erfolgt ein 4 Minuten langer Durchgang, um den Vorgang des Ansaugens der nächsten Probe und der Vorbereitung auf die Injektion zu starten. Damit wird im Normalfall pro Injektion der Vorgang um eine halbe bis eine Minute verkürzt.

Erzielen der geringstmöglichen Verschleppung

Verschleppung wird gemessen, wenn Restpeaks von einer vorherigen aktiv-haltigen Injektion in einer anschließenden Leerlösungsmittelinjektion auftauchen. Es ist grundsätzlich mit einer Verschleppung zwischen aktiv-haltigen Injektionen zu rechnen, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Der Verschleppungsgrad wird als Fläche des Peaks im reinen Lösungsmittel wiedergegeben, ausgedrückt als prozentualer Anteil der entsprechenden Peakfläche in der vorherigen aktiv-haltigen Injektion. Durch das durchdachte Design des Flusswegs und die Verwendung von Materialien mit minimaler Probenadsorption ist der automatische Probengeber Agilent 1260 Infinity für die geringstmögliche Verschleppung optimiert. Eine Verschleppungszahl von 0,002 % sollte erzielbar sein, auch wenn ein dreifacher Quadrupolmassenspektrometer der Detektor ist. Betriebseinstellungen des automatischen Probengebers ermöglichen es dem Benutzer, die entsprechenden Parameter einzustellen, um die Verschleppung durch Anwendungen mit Verbindungen zu minimieren, die leicht am System kleben bleiben.

Die folgenden Funktionen des automatischen Probengebers können zur Minimierung der Verschleppung verwendet werden:

- Interne Nadelreinigung
- Externe Nadelreinigung
- Nadelsitz zurückspülen
- Injektionsventil reinigen

Der Flussweg, einschließlich der Nadel-Innenseite, wird bei Normalbetrieb ständig gespült und stellt in den meisten Situationen eine gute Eliminierung von Verschleppung sicher. Automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens (ADVR) reduziert das Verzögerungsvolumen, reduziert aber auch das Spülen des Probengebers und sollte nicht für Analyten verwendet werden, bei denen Verschleppung ein Problem sein könnte.

Um die Verschleppung zu minimieren, sollten Sie die folgenden Empfehlungen beachten:

- Verwenden Sie den automatischen Probengeber stets mit dem Injektionsventil in Injektionsstellung.
- Spülen Sie die Außenseite der Nadel am Spülanschluss mit einem geeigneten Lösungsmittel. Die Spülzeit sollte mindestens 10 s betragen.

- Verringern Sie die Aufziehgeschwindigkeit nach Möglichkeit auf 10 µL/min.
- Verwenden Sie verschlossene Agilent 2 mL-Probenflaschen (Schraubverschlussflasche, 2 mL (5182-0556)).
- Falls der Nadelsitz kontaminiert ist, verwenden Sie ein geeignetes Spülverfahren.
- Verwenden Sie zum Spülen Lösungsmittel, in denen die Probensubstanzen löslich sind.
- Verwenden Sie saure mobile Phasen für basische Substanzen.

Spülen und Reinigen des Probengebers, um eine Verschleppung nahe Null zu erreichen

Während des Injektionsvorgangs befinden sich die Probenschleife, die Innenseite der Nadel, die Sitzkapillare und der Hauptkanal des Injektionsventils im Flussweg, wo sie während der gesamten Laufzeit bleiben. Dies bedeutet, dass diese Teile während der gesamten Analyse kontinuierlich mit der mobilen Phase gespült werden. Lediglich während des Ansaugens der Probe wird das Injektionsventil aus dem Flussweg entfernt. In dieser Position wird der Fluss aus der Pumpe direkt auf die Säule geleitet. Vor der Injektion werden die Außenflächen der Nadel mit frischem Lösungsmittel gespült. Dies erfolgt mit Hilfe des Spülanschlusses des Probengebers. Hierdurch wird eine Kontamination des Nadelsitzes verhindert. Der Spülanschluss des Probengebers wird durch eine peristaltische Pumpe, die in das Gehäuse integriert ist, mit frischem Lösungsmittel gefüllt. Der Spülanschluss hat ein Volumen von etwa 680 µL und die Pumpe fördert 6 mL/min. Wenn eine Spülzeit von 10 s eingestellt wird, bedeutet dies, dass das Volumen des Spülanschlusses mehrmals mit frischem Lösungsmittel aufgefüllt wird, was in den meisten Fällen für die Reinigung der Nadelaußenfläche genügt.

Erzielen einer höheren Auflösung

Eine erhöhte Auflösung in einer Trennung wird die qualitative und quantitative Datenanalyse verbessern, die Trennung von mehr Peaks ermöglichen oder einen weiteren Spielraum für die Beschleunigung der Trennung bieten. Dieser Abschnitt erläutert, wie die Auflösung durch die Überprüfung der folgenden Punkte erhöht werden kann:

- Optimieren der Selektivität
- Kleinere Partikelgrößenpackung
- Längere Säulen
- Flachere Gradienten, schnellerer Fluss
- Minimales Extrasäulenvolumen
- Optimierung des Injektionslösungsmittels und -volumens
- Datensammlung ausreichend schnell

Resolution zwischen zwei Peaks wird von der Auflösungsgleichung beschrieben:

$$Rs = \frac{1}{4}\sqrt{N}\,\frac{(\alpha - 1)}{\alpha}\,\frac{(k_2 + 1)}{k_2}$$

wobei

- R_s=Auflösung,
- N=Tellerzahl (Maßstab für Säuleneffizienz),
- α=Selektivität (zwischen zwei Peaks),
- k_2=Retentionsfaktor des zweiten Peak (ehemals Kapazitätsfaktor genannt).

Der Faktor, der die signifikanteste Wirkung auf die Auflösung hat, ist die Selektivität α. Die experimentelle Variation dieses Faktors umfasst die Änderung der stationären Phase (C18, C8, Phenyl, Nitril etc.), der mobilen Phase und der Temperatur, um die Selektivitätsdifferenzen zwischen den zu trennenden gelösten Stoffen zu maximieren. Das ist mit viel Arbeit verbunden, die am Besten mit einem Automatikmethodenentwicklungssystem erfolgt, das die Bewertung eines breiten Bereichs an Bedingungen auf verschiedenen Säulen und mobilen Phasen in einem geregelten Aufklärungsprotokoll ermöglicht.

Dieser Abschnitt bespricht, wie eine höhere Auflösung mit gewählten stationären und mobilen Phasen erzielt wird. Wenn zur Entscheidung über Phasen ein automatisiertes Methodenentwicklungssystem verwendet wurde, ist es wahrscheinlich, dass bei allen Untersuchungsschritten kurze Säulen für die schnelle Analyse eingesetzt wurden.

Die Auflösungsgleichung zeigt, dass der nächstwichtige Faktor die Bodenzahl oder Effizienz N ist, die mit verschiedenen Methoden optimiert werden kann. N ist umgekehrt proportional zur Teilchengröße und direkt proportional zur Länge der Säule und daher ergeben eine kleinere Partikelgröße und eine längere Säule eine höhere Tellerzahl. Der Druck steigt mit dem inversen Quadrat der Teilchengröße und proportional zur Länge der Säule. Die Auflösung erhöht sich mit der Quadratwurzel aus N. Durch eine Verdoppelung der Säulenlänge wird die Auflösung also um den Faktor 1,4 erhöht. Was erzielbar ist, hängt von der Viskosität der mobilen Phase ab, da sich dies direkt auf den Druck bezieht. Methanolmischungen erzeugen mehr Gegendruck als Acetonitrilmischungen. Acetonitril wird häufig bevorzugt, da die Peak-Formen besser und schmäler zusätzlich zur niedrigeren Viskosität sind, doch erzielt Methanol im Allgemeinen eine bessere Selektivität (für kleine Moleküle bestimmt weniger als rund 500 Da). Die Viskosität kann durch Erhöhung der Temperatur erhöht werden, doch sollte nicht vergessen werden, dass dies die Selektivität der Trennung ändern kann. Tests werden zeigen, ob dies zu einer erhöhten oder reduzierten Selektivität führt. Bei einer Erhöhung des Flusses und des Drucks steigt die Reibungswärme in der Säule an. Dies kann zu einer geringfügig erhöhten Dispersion und eventuell zu einer schwachen Änderung der Selektivität führen. Beides zeigt sich als Verminderung der Auflösung. Der letztere Fall kann eventuell durch Reduzieren der Temperatur des Thermostaten um ein paar Grad ausgeglichen werden und dann werden erneute Tests die Antwort erbringen.

Die Van Deemter-Kurve zeigt, dass die optimale Flussrate durch eine STM-Säule höher ist als für größere Partikel und ziemlich flach, wenn die Flussrate zunimmt. Normalerweise sind fast optimale Flussraten für STM-Säulen: 2 ml/min für 4,6 mm ID; und 0,4 ml/min für 2,1 mm ID-Säulen.

Bei isokratischen Trennungen führt die Erhöhung des Retentionsfaktors, k, zu einer besseren Auflösung, da der aufgelöste Stoff länger festgehalten wird. Bei Gradiententrennungen wird die Retention durch k^* in der folgenden Gleichung beschrieben:

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

wobei:

- k^* = durchschnittlicher k-Wert,
- t_G = Zeitlänge des Gradienten (oder Segment des Gradienten) (min),
- F = Fluss (mL/min),
- V_m = Säulenverzögerungsvolumen,
- Δ%B = Änderung der Fraktion von Lösungsmittel B bei Gradient,
- S = konstant (ca. 4 - 5 für kleine Moleküle).

Dies zeigt, dass k und so die Auflösung durch flachere Gradienten erhöht werden kann (2 bis 5 %/min Änderung als Richtlinie), höhere Flussrate und eine Säule mit geringerem Volumen. Diese Gleichung zeigt auch, wie ein vorhandener Gradient beschleunigt wird - wenn der Fluss verdoppelt, aber die Gradientenzeit halbiert wird, k^* bleibt konstant und die Trennung sieht gleich aus, erfolgt jedoch in der halben Zeit.

Eine Verringerung des Extrasäulenvolumens verringert die Dispersion und sorgt für eine bessere Auflösung. Im Binären LC 1260 Infinity ist dies bereits optimiert. Er ist mit einer Max-Light-Kartuschenzelle und Narrowbore-Kapillaren (ID 0,12 mm) ausgestattet (stellen Sie sicher, dass die geringstmögliche Länge zwischen Säule und Detektor verwendet wird).

Um die Verbesserung der Auflösung auch zu nutzen, benötigt man schließlich eine Datenerfassung, die schnell genug ist, um die schmalen Peaks richtig abzubilden.

Zusammenfassend sollten für eine Erhöhung der Auflösung die folgenden Schritte befolgt werden:

- Als erster Schritt zur Verbesserung der Auflösung müssen immer verschiedene stationäre Phasen getestet und die Säule mit der besten Trennung ausgewählt werden. Dies ist der wichtigste Parameter für die Auflösung.
- Als zweiter Schritt sollten lange oder sogar gekoppelte Säulen verwendet werden, um die Bodenzahl zu erhöhen.
- Der dritte Schritt besteht darin, Peaks zu höheren Retentionsfaktoren zu verschieben. Für k-Werte von 5 bis 10 ist der Einfluss signifikant. Bei höheren k-Werten ist der Effekt sehr gering.

In der Praxis heißt das, dass längere Säulen mit geeigneter Selektivität eine bessere Auflösung ergeben.

Optimale Gerätekonfiguration für hohe Auflösung

Säulenthermostat

Für Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm kann der Säulenthermostat in der Standardversion verwendet werden. Bei Flussraten über 2 mL/min und Temperaturen über 60 °C sollte das Säuleneluat auf die Temperatur des Detektors gekühlt werden, indem die 1,5 µL-Heizung/Kühlung des Säulenthermostaten verwendet wird. Dies sorgt für einen minimalen Rauschpegel bei UV-Detektoren, selbst bei 5 mL/min und 80 °C (siehe Abbildung 18 auf Seite 58).

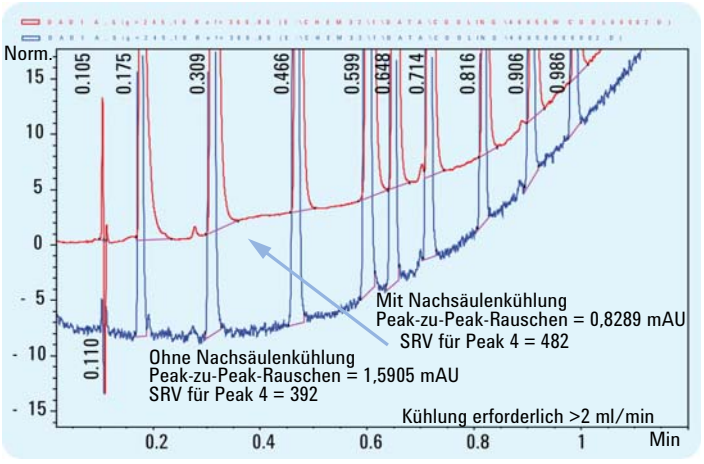


Abbildung 18 Einfluss der Nachsäulenkühlung (PCC, post column cooling) auf das Basislinienrauschen

Wenn Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm bei niedrigen Flussraten verwendet werden, sollte die kleine Heizvorrichtung für ein minimales Extrasäulenvolumen benutzt werden.

Extrasäulenvolumen

Um die auf der Säule erzielte hohe Auflösung beizubehalten, sollte das Extrasäulenvolumen, insbesondere nach der Säule, möglichst klein sein.

- Für Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm wird die Standardkonfiguration für das Verzögerungsvolumen empfohlen, siehe Abbildung 15 auf Seite 45.
- Für Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm sollte die Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen der Pumpe verwendet werden; im Säulenthermostaten sollte das Kit für geringe Dispersion installiert werden. Zur Erzielung höchster UV-Empfindlichkeit ist auch der Einsatz des kurzen Mischers empfehlenswert. Siehe Abbildung 13 auf Seite 43 und Abbildung 14 auf Seite 44.
- Auch das Injektionsvolumen ist von Bedeutung, insbesondere wenn die Probe in einem organischen Lösungsmittel gelöst ist. In diesem Fall sollte der Gradient mit einem geringen Prozentsatz der organischen Phase beginnen, um die Substanzen am Säulenkopf zu fokussieren. Dies verhindert eine Peakdispersion durch den Injektionsvorgang.
- Die 10 mm-Max-Light-Kartuschenzelle hat ein geringes Dispersionsvolumen (σ Volumen 1,0 µL); somit ist keine weitere Volumenoptimierung erforderlich.
- In Situationen, in denen die alternative 60 mm-Max-Light-Hochempfindlichkeitszelle verwendet wird, um eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen, wird das Zellenvolumen für die Verwendung von Säulen mit Innendurchmessern von 3 mm und 4,6 mm optimiert.

Datenrate

Die Einstellung für die Datenrate im UV-Detektor muss passend gewählt werden. Die Auswahl einer zu niedrigen Datenrate führt zu erhöhter Peakbreite und geringerer Auflösung, siehe Abbildung 19 auf Seite 60.

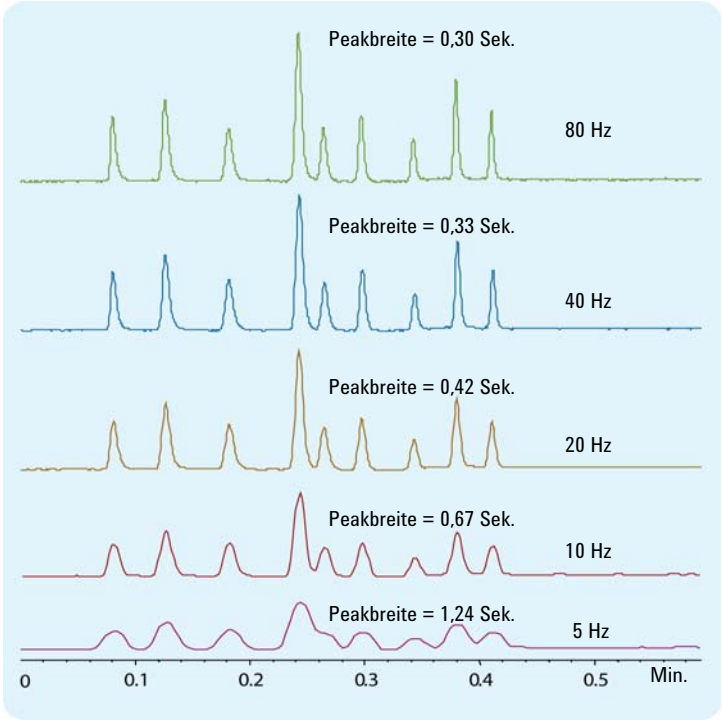


Abbildung 19 Peakbreite in Abhängigkeit von UV-Datenrate

Tabelle 6 auf Seite 61 zeigt die Abhängigkeit der Peakbreite, der Auflösung und der Peakkapazität von der Datenrate. Für die schnelle und ultraschnelle LC sind hohe Datenraten erforderlich, andernfalls würde die auf der Säule erzielte Trennung im Detektor zunichte gemacht.

Tabelle 6 Beziehung zwischen Datenrate und chromatographischer Leistung

Datenrate	Peakbreite	Auflösung	Peakkapazität
80 Hz	0,300	2,25	60
40 Hz	0,329	2,05	55
20 Hz	0,416	1,71	45
10 Hz	0,666	1,17	29
5 Hz	1,236	0,67	16

80 Hz Datenrate führt im Vergleich zu einer Datenrate von 20 Hz zu folgenden Verbesserungen:

- Peakbreite:

  – 30 %
- Auflösung:

  + 30 %
- Peakkapazität:

  + 40 %
- wahrnehmbare Säuleneffizienz:

  + 70 %

Chromatographische Bedingungen

Wie bereits erwähnt hängen die chromatographischen Bedingungen von den zu analysierenden Substanzen ab. Auch hier gelten allerdings einige Faustregeln.

- Es sollten mittlere Flussraten verwendet werden. In aktuellen Versuchen hat sich jedoch gezeigt, dass auch höhere Flussraten für eine verbesserte Trennung von Vorteil sein können. Für Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm, die mit Sub-2-µm-Partikeln gepackt sind, wird eine Flussrate von 2 mL/min als Startwert empfohlen. Für Sub-2-µm-Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm sind 0,4 mL/min ein guter Ausgangswert.
- Verwenden Sie mittlere Gradienten, beispielsweise eine Gradientenänderung von 2 – 5 % pro Minute.

- Die Säulentemperatur ist ein weiterer Parameter für die Optimierung. Da auch die Temperatur eine Trennung beeinflussen kann, sollte sie nicht übersehen werden.

Erzielen einer höheren Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit einer Trennungsmethode hängt von der Wahl der stationären und mobilen Phasen ab, da eine gute Trennung mit schmalen Peaks und einer stabilen Basislinie mit minimalem Geräusch erwünscht ist. Die Wahl der Gerätekonfiguration hat eine Auswirkung und eine bedeutende Auswirkung ergibt sich über die Einrichtung des Detektors.

Optimale Gerätekonfiguration für hohe Empfindlichkeit

Allgemeine Hinweise

- Zur Minimierung des Basislinienrauschens wird die Standardkonfiguration für das Verzögerungsvolumen der Binären Pumpe 1260 Infinity empfohlen.
- Auch hier sind das Injektionsvolumen und das Lösungsmittel, in dem die Probe gelöst wird, von Bedeutung. Es ist darauf zu achten, dass die Substanzen am Säulenkopf fokussiert werden, um eine Peakdispersion aufgrund der Injektion zu vermeiden, da dies zu einer Verringerung der Peakhöhe führen würde. Hierzu muss die Probe in einer Lösungsmittelzusammensetzung gelöst werden, die eine geringere Elutionsstärke als die mobile Phase aufweist.
- Die Säulentemperatur sollte nicht zu niedrig sein, um eine starke Retention der Peaks auf der Säule zu verhindern. Dies würde auch Peakdispersion und eine geringere Peakhöhe verursachen.
- Die Datenrate des UV-Detektors sollte entsprechend der aktuellen Peakbreite gewählt werden. Eine höhere Datenrate als nötig würde einen höheren Rauschpegel verursachen und sollte daher vermieden werden.
- Verfügbare UV-Detektoren sind der Diodenarray-Detektor Agilent 1260 Infinity (G4212B) und der Variable Wellenlängendetektor Agilent 1260 Infinity (G1314F) mit Datenraten von 80 Hz. Rauschpegel und Drift sind hier signifikant verringert.
- "Wahl einer Flusszelle" auf Seite 66 bietet einen Überblick über die Flusszellen, die für den G4212B DAD verfügbar sind. Informationen zu den Flusszellen, die mit dem G1314F VWD verwendet werden, finden Sie im Benutzerhandbuch zum Variablen Wellenlängendetektor Agilent 1260 Infinity .

Chromatographische Bedingungen

Für ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist es von Vorteil, wenn die Peaks schnell eluieren.

- Bei niedrigen k'-Werten sollten höhere Flussraten verwendet werden, um die Peaks zu eluieren.
- Es können auch schnellere Gradienten eingesetzt werden, um die Peaks bei niedrigen k'-Werten zu eluieren.

Säulen

Empfindlichkeit wird als Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) angegeben und daher die Notwendigkeit, Peakhöhe zu maximieren und Basisliniengeräusch zu minimieren. Jede Reduktion der Peakdispersion wird helfen, die Peakhöhe zu erhalten und daher sollte Extrasäulenvolumen minimiert werden, indem ein kurzer, schmaler Innendurchmesser, Verbindungskapillaren und richtig installierte Verschraubungen verwendet werden. Der Verwendung von Säulen mit kleineren Innendurchmessern sollte eine größere Peakhöhe zur Folge haben und ist daher ideal für Anwendungen mit begrenzten Probengrößen. Wenn dieselbe Probenmenge in eine Säule mit kleinerem ID injiziert werden kann, dann ist die Verdünnung infolge des Säulendurchmessers geringer und die Empfindlichkeit wird sich erhöhen. Wenn zum Beispiel der Säulen-ID von 4,6 mm auf 2,1 mm reduziert wird, führt das zu einem theoretischen Gewinn an Peakhöhe von 4,7 times aufgrund der reduzierten Verdünnung in der Säule. Für einen Massenspektrometerdetektor können die niedrigeren Flussraten von schmaleren Säulen zu höheren Ionisierungseffizienzen und damit höherer Empfindlichkeit führen.

Detektoreinstellungen

Die Leistungsfähigkeit des Detektors kann durch verschiedene Parameter optimiert werden. Im Folgenden wird beschrieben, wie sich die Detektorparameter auf die Leistung auswirken:

- Flusszellen beeinflussen die Empfindlichkeit.
- Wellenlängen und Bandbreiten beeinflussen die Empfindlichkeit, Selektivität und Linearität.
- Spaltbreiten beeinflussen die Empfindlichkeit, spektrale Auflösung und Linearität.
- Peakbreiten beeinflussen die Empfindlichkeit und Auflösung.

Wahl einer Flusszelle

Die Max-Light-Kartuschenzelle ist in verschiedenen Versionen verfügbar, siehe Tabelle 7 auf Seite 66.

Tabelle 7 Spezifikationen für Max-Light-Kartuschenzellen

Kartuschenzellen	• Max-Light-Kartuschenzelle (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008) • Max-Light-Kartuschenzelle bioinert (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G5615-60018) • Max-Light-Kartuschenzelle (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007) • Max-Light-Kartuschenzelle bioinert (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G5615-60017) • Max-Light-Kartuschenzelle HDR (3,7 mm, V(s) 0,4 µL) (G4212-60032) • Max-Light-Kartuschenzelle ULD (10 mm, V(s) 0,6 µL) (G4212-60038) • Max-Light-Testkartuschenzelle (G4212-60011)
Maximaler Druck	70 bar (1015 psi) Maximaler Betriebsdruck (MOP)[1] 150 bar (2175 psi) Maximal anfallender Druck (MIP)[2]
pH-Bereich	1,0-12,5 (lösungsmittelabhängig)

[1] Maximaler Betriebsdruck (MOP): der maximale Druck, bei dem das System unter normalen Bedingungen kontinuierlich betrieben werden kann.

[2] Maximal anfallender Druck (MIP): der maximale Druck, der in einem System kurzzeitig auftreten kann.

Normale Anwendungen

Die Max-Light-Kartuschenzelle (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008) deckt ein breites Spektrum von Anwendungen ab:

- alle Säulendurchmesser bis zu 2,1 mm ID oder sogar weniger
- Anwendungen mit einer Peakdispersion (Peakbreite x Flussrate) größer oder gleich ~2 µL [Beispiel: Peakbreite = 0,04 min bei Flussrate = 0,1 mL/min ergibt eine Peakdispersion von 0,04 min x 0,1 mL/min = 0,004 mL = 4 µL]

Hohe Empfindlichkeit

Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, kann die Max-Light-Kartuschenzelle (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007) verwendet werden. Diese Zelle verbessert die Leistung des Detektors, indem die Nachweisgrenze etwa um den Faktor 3 (je nach Anwendung) herabgesetzt wird.

Ultraniedrige Dispersion

Die Max-Light-Kartuschenzelle ULD kann zusammen mit dem G4212A DAD und dem G4212B DAD verwendet werden. Die Zelle ist für die Anwendung mit dem Set für ultraniedrige Dispersion erforderlich. Diese Lösung gibt es aktuell als 1290 Infinity Ultra-Low Dispersionskit (5067-5189). Die Zelle sollte Bestandteil der Lösung für ultraniedrige Dispersion sein.

Hoher Dynamikbereich

Die Max-Light-Kartuschenzelle HDR kann zusammen mit dem G4212A DAD und dem G4212B DAD verwendet werden. Diese Zelle ist für die High Dynamic Range-Anwendung (HDR) erforderlich, eine Lösung für einen hohen Dynamikbereich, welche im März/April 2013 eingeführt wird.

HINWEIS

Um die Flusszelle vor Überdruck zu schützen, z.B. in Systemen mit LC/MS, installieren Sie das Inline-Druckentlastungsventil-Set (G4212-68001)vgl. Handbuch zu den *Agilent Diodenarray-Detektoren der Serie 1200 Infinity*.

Verstopfung von Säulen vermeiden

Für Säulen, die mit Partikeln unter 2 µm gepackt sind, sind Fritten mit kleiner Porengröße erforderlich, um zu verhindern, dass Packungsmaterial aus der Säule gespült wird. Dadurch erhöht sich unmittelbar das Risiko einer Verstopfung dieser Fritten mit Partikeln aus der Probe, der mobilen Phase oder/und dem Gerät selbst. Zum Schutz der Säule können zusätzliche kleine Filter (Abbildung 20 auf Seite 69) vor der Säule verwendet werden. Zudem wird empfohlen, die Probe sorgfältig zu filtrieren oder/und zu zentrifugieren und die mobile Phase von Partikeln jeder Art frei zu halten.

Diese einfachen Gebrauchsregeln helfen, Verstopfungen zu vermeiden:

1. Installieren und betreiben Sie Säulen nur in der auf der Säule vermerkten Flussrichtung.
2. Verwenden Sie ausschließlich Lösungsmittel von chromatographischem Reinheitsgrad und hoher Qualität.
3. Filtern Sie alle wässrigen Puffer und alle Proben vor der Verwendung durch einen geeigneten 0,2 µm-Filter.
4. Ersetzen Sie die Flaschen mit Pufferlösungen für die mobile Phase alle 24 – 48 h. Füllen Sie keine mobile Phase in die Flasche; verwenden Sie stets eine neue Flasche.
5. Verwenden Sie keine mit hochkonzentrierten Salzlösungen gepufferten mobilen Phasen (> 50 mM) in Kombination mit Acetonitril, um Ausfällung zu vermeiden.
6. Es ist empfehlenswert, einen Inlinefilter zu verwenden, um Partikel abzufangen und die Lebensdauer der Säule zu verlängern. Verwenden Sie für Ihre Säule den passenden 1260 Infinity-Inlinefilter: 1260 Infinity LC Inlinefilter, 2,1 mm, 0,2 µm Porengröße, max. 600 bar, Verbindungskapillare 70 x 0,12 mm SS (5067-1551) für Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm, 1260 Infinity LC Inlinefilter, 4,6 mm, 0,2 µm Porengröße, max. 600 bar, Verbindungskapillare 90 x 0,17 mm SS (5067-1553) für Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm oder 3,0 mm. Wechseln Sie den Filter, wenn der Druck um 10 % ansteigt.
7. Spülen Sie sämtliche pufferhaltigen mobilen Phasen aus den Pumpen (und den Verbindungen bis zur Säule) und leiten Sie 5 mL Lösungsmittel durch die Säule, bevor Sie sie an das Gerät anschließen.

8 Spülen Sie die Säule mit kompatibler mobiler Phase, wobei Sie mit 0,1 mL/min bei einer Säule mit 2,1 mm Innendurchmesser, 0,2 mL/min bei 3,0 mm Innendurchmesser und 0,4 mL/min bei 4,6 mm Innendurchmesser langsam beginnen. Steigern Sie die Flussrate innerhalb von 5 Minuten bis auf den gewünschten Durchfluss.

9 Wenn sich der Druck stabilisiert hat, schließen Sie die Säule am Detektor an.

10 Äquilibrieren Sie die Säule und den Detektor vor Gebrauch mit 10 Säulenvolumina der mobilen Phase. (1 – 5 mL je nach Säulengröße.)

11 Vermeiden Sie Überdruck. Überprüfen Sie vor dem Beginn jeder Sequenz den Druckbereich Ihres Gradienten, der 100 – 130 bar oder mehr betragen kann.

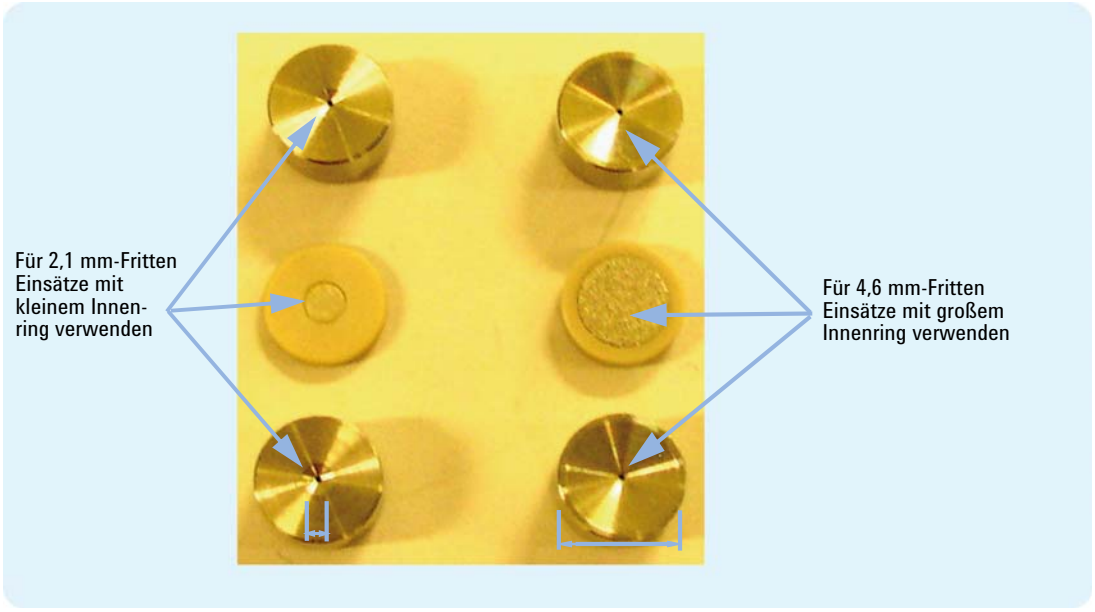


Abbildung 20 Schutz für Säulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 und 2,1 mm, die mit 1,8-µm-Partikeln gepackt sind, Einlassfritte mit einer Porengröße von 0,2 µm

4
Einrichtung und Installation

Installation der Software 72
Installation der Module 74
- Installation der Systemmodule 74
- Integration in ein Netzwerk 74
- Kapillaren- und Schlauchverbindungen im Flussweg 75
- Spülen des Systems 80

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Softwareinstallation, zur Installation der Module und zur Vorbereitung des Systems für den Betrieb.

Installation der Software

Installation der Software-Steuerung und des Datensystems

Einzelheiten zur Installation der Software finden Sie im Handbuch für den Detektor und in den Software-Handbüchern.

Installation der Agilent Lab Advisor-Software

Einzelheiten zur Installation der Agilent Lab Advisor-Software finden Sie in der Software-Dokumentation auf der Lab Advisor-DVD.

Die Agilent Lab Advisor-Software ersetzt und erweitert die Diagnosefunktionen, die bisher nur mit der ChemStation-Software verfügbar waren.

Agilent Lab Advisor ist eine Windows-basierte Anwendung, die Geräte im Labor kontinuierlich und in Echtzeit überwacht und durch automatische Meldungen über den Wartungs- und Servicebedarf mithilfe von leistungsfähigen Zählern die Produktivität deutlich erhöht. Auf diese Weise werden Probleme behoben, bevor sie die Ergebnisse beeinträchtigen. Die Software schließt umfassendes Informations- und Dokumentationsmaterial, eine Sammlung von Rechnern und anderen Werkzeugen, die Sie bei der Einrichtung, Kalibrierung und Instandhaltung Ihres Geräts unterstützen, sowie Tests und Diagnosefunktionen zur Leistungsüberprüfung ein. Agilent Lab Advisor gibt außerdem Rückmeldung bei auftretenden Gerätefehlern und schlägt Lösungen vor. Die Software arbeitet sowohl mit als auch ohne Agilent Datensysteme.

Die Software überwacht:

- Status des LC-Moduls
- Frühwarnsystem für fällige Wartungen (meldet die Notwendigkeit einer Aktualisierung oder eines Austauschs)

Außerdem führt die Software Folgendes aus:

- Sie automatisiert nützliche Tests,
- versucht, unterstützte LAN-basierte Geräte zu identifizieren, die eingeschaltet und mit dem Labornetzwerk des PCs verbunden sind,
- schlägt automatisch Ersatzteile und Fehlerbehebungsmaßnahmen für einige häufige Geräteprobleme vor.

Installation der Module

Installation der Systemmodule

Einzelheiten zur Installation der Module finden Sie in den Handbüchern für die einzelnen Module. Diese Handbücher enthalten außerdem Informationen zu den Spezifikationen, zur Wartung und zu den Geräteteilen.

Integration in ein Netzwerk

Informationen zur Integration Ihres Systems in ein Netzwerk finden Sie in den Benutzerhandbüchern der einzelnen Module (Kapitel *LAN-Konfiguration*).

Kapillaren- und Schlauchverbindungen im Flussweg

Je nach der Systemkonfiguration werden Kapillaren mit unterschiedlichen Längen und Durchmessern verwendet. Sie sind im Folgenden beschrieben.

Informationen zu Kapillaren- und Schlauchverbindungen innerhalb der Module finden Sie in den Modulhandbüchern.

Verbindungen für die Standardkonfiguration des Verzögerungsvolumens

Abbildung 21 auf Seite 76 zeigt die Kapillaren- und Schlauchverbindungen im Flussweg für die Standardkonfiguration des Verzögerungsvolumens des Binären LCs 1260 Infinity.

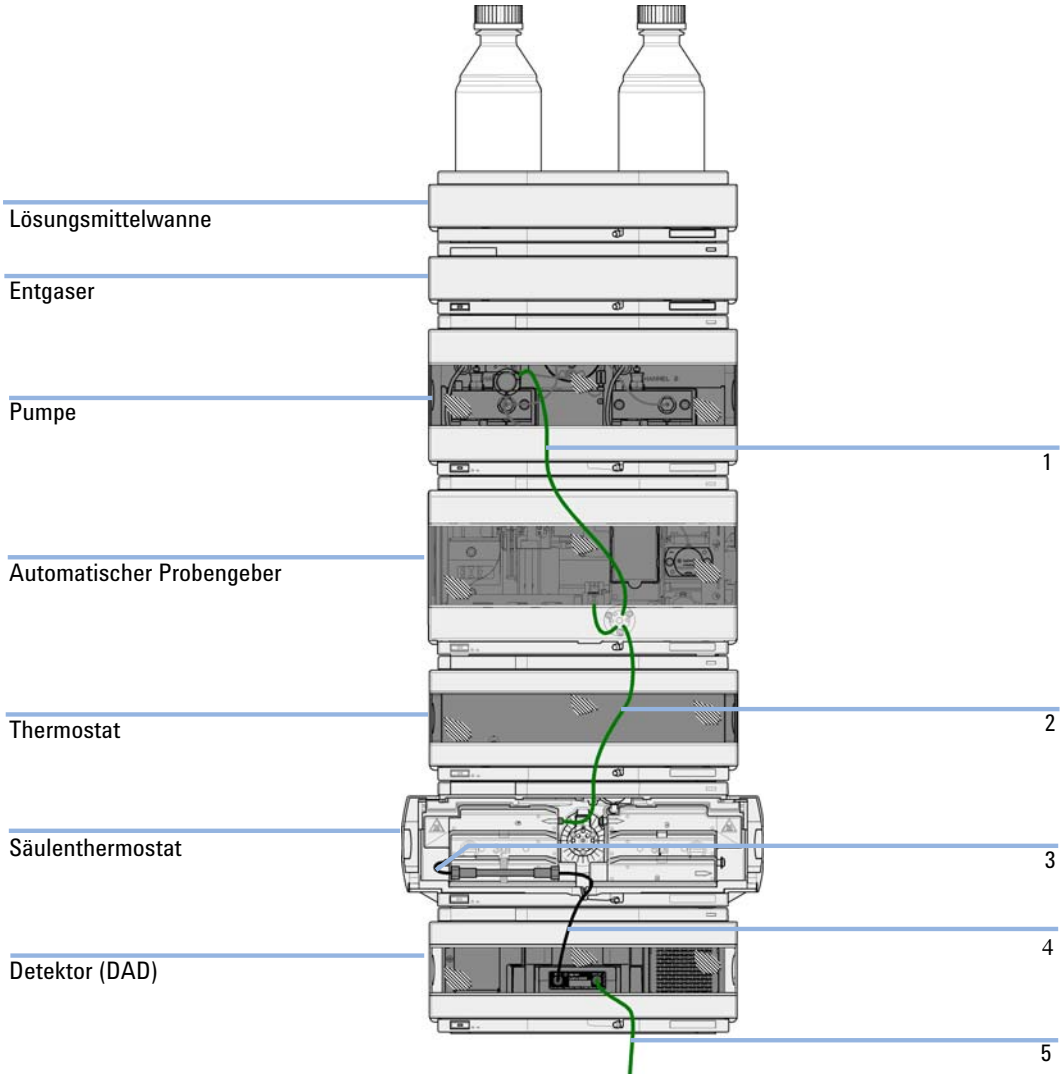


Abbildung 21 Kapillaren- und Schlauchverbindungen im Flussweg (Standardkonfiguration für Verzögerungsvolumen)

Nr.	Best.-Nr.	Beschreibung
1	G1312-87303	Kapillare ST 0,17 mm x 400 mm S/S (Pumpe zu Probengeber)
1	G1312-87304	Kapillare ST 0,17 mm x 700 mm S/S (Pumpe zum gekühlten Probengeber)
2	G1367-87304	Kapillare ST 0,17 mm x 250 mm S/S (Probengeber zu Säulenthermostat)
2	01090-87306	Kapillare ST 0,17 mm x 380 nm S/S (gekühlter Probengeber zu Säulenthermostat)
3	G1316-87300	Kapillare ST 0,17 x 90 mm S/S (Säulenthermostat zu Säule)
4	G1315-87311	Kapillare ST 0,17 mm x 380 mm S/S (Säule zu DAD)
5	5062-2462	Schlauch PTFE 0,8 mm x 2 m, Nachbestellung 5 m (DAD zu Abfluss)
5	5062-8535	Zubehörsatz Abfluss (VWD zu Abfluss)

Verbindungen für die Konfiguration für mittleres und geringes Verzögerungsvolumen

Abbildung 22 auf Seite 78 zeigt die Kapillaren- und Schlauchverbindungen im Flussweg für die Konfigurationen für mittleres und geringes Verzögerungsvolumen des Binären LCs 1260 Infinity.

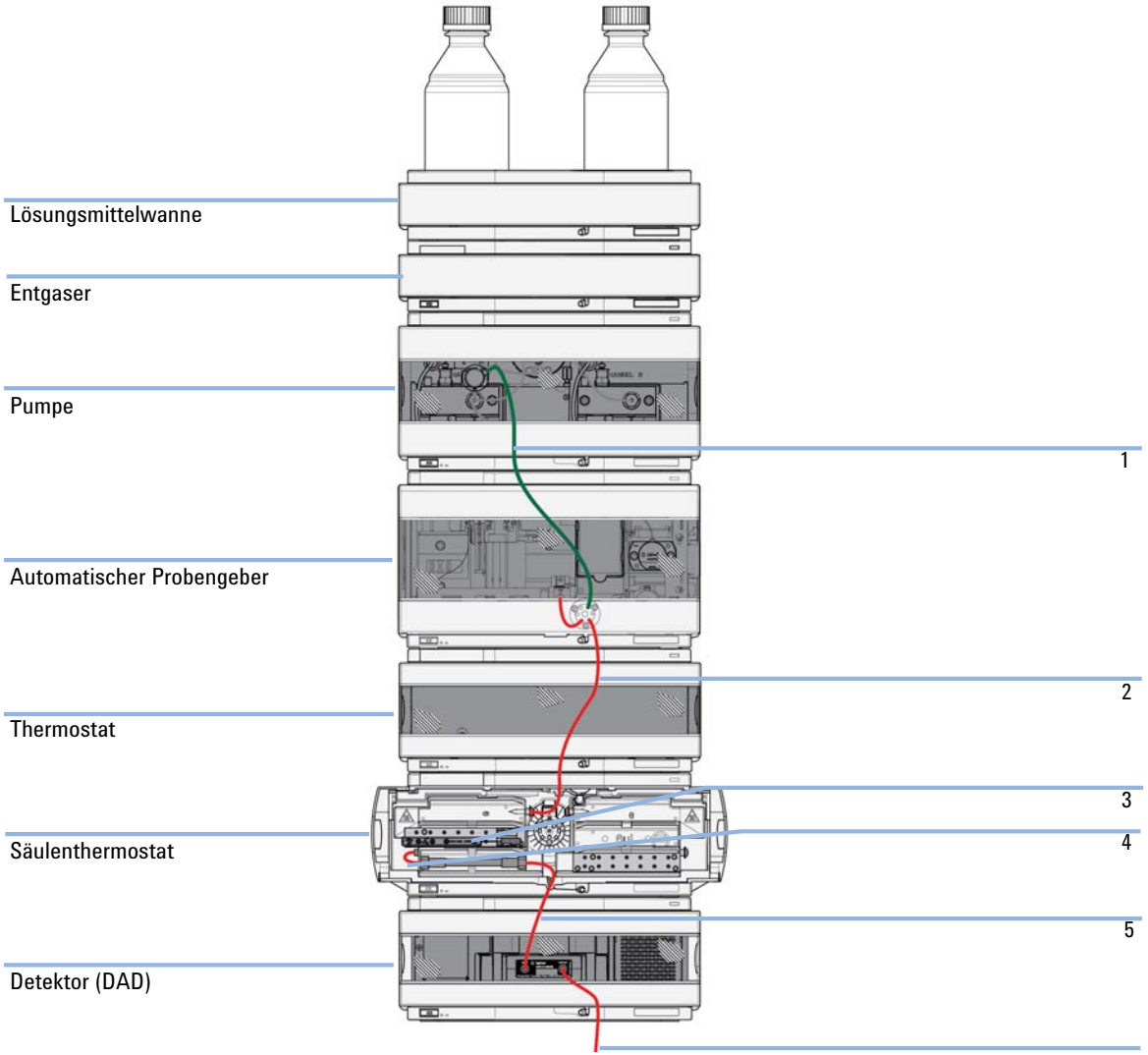


Abbildung 22 Kapillaren- und Schlauchverbindungen im Flussweg (Konfiguration für mittleres und geringes Verzögerungsvolumen)

Nr.	Best.-Nr.	Beschreibung
1	G1312-87303	Kapillare ST 0,17 mm x 400 mm S/S (Pumpe zu Probengeber)
1	G1312-87304	Kapillare ST 0,17 mm x 700 mm S/S (Pumpe zum gekühlten Probengeber)
2	G1313-87304	Kapillare ST 0,12 mm x 180 mm S/S (Probengeber zu Säulenthermostat)
2	01090-87610	Kapillare ST 0,12 mm x 280 mm S/S (gekühlter Probengeber zu Säulenthermostat oder zu 3, falls installiert)
3	G1316-80002	Heizung Ausführung oben (0,12 mm Innendurchmesser, 1,6 µL Innenvolumen)
3	G1316-80003	Heizung Ausführung unten (0,12 mm Innendurchmesser, 1,6 µL Innenvolumen)
4	01090-87611	Kapillare ST 0,12 mm x 105 mm S/S (Säulenthermostat zu Säule, nicht erforderlich, wenn 3 installiert ist)
5	G1315-87312	Kapillare ST 0,12 mm x 150 mm S/S (Säule zu DAD)
6	5062-2462	Schlauch PTFE 0,8 mm x 2 m, Nachbestellung 5 m (DAD zu Abfluss)

Spülen des Systems

Anfangsspülung

Wann erforderlich

Bevor ein Entgaser oder ein Lösungsmittelschlauch verwendet werden kann, muss das System vorgespült werden. Isopropanol empfiehlt sich als Lösungsmittel zum Spülen, da es sich mit fast allen HPLC-Lösungsmitteln mischen lässt und ausgezeichnete Befeuchtungseigenschaften aufweist.

Erforderliche Teile

Anzahl	Beschreibung
1	Isopropanol

Vorbereitungen

Verbinden Sie alle Module hydraulisch wie in den jeweiligen Handbüchern der Module beschrieben.

Füllen Sie jede Lösungsmittelflasche mit 100 mL Isopropanol.

Schalten Sie das System ein.

WARNUNG

Beim Öffnen von Kapillar- oder Schlauchleitungsverschraubungen können Lösungsmittel austreten.

Der Umgang mit giftigen und gefährlichen Lösungsmitteln und Reagenzien kann Gesundheitsrisiken bergen.

➔ Beachten Sie die entsprechenden Sicherheitsanweisungen (z. B. Schutzbrille, Handschuhe und Schutzkleidung tragen), wie sie in der vom Lösungsmittellieferanten mitgelieferten Gebrauchsanweisung oder im Sicherheitsdatenblatt beschrieben ist. Dies gilt insbesondere für giftige oder gefährliche Lösungsmittel.

HINWEIS

Das Spülwerkzeug von Lab Advisor kann verwendet werden, um die Pumpe automatisch zu spülen.

HINWEIS

Wenn die Pumpe das Lösungsmittel nicht von den Flaschen ansaugen kann, verwenden Sie eine Spritze, um das Lösungsmittel manuell durch die Schläuche und den Entgaser zu leiten.

HINWEIS Beim Spülen des Vakuumentgasers mit einer Spritze wird das Lösungsmittel sehr schnell durch den Entgaser geleitet. Daher ist das Lösungsmittel am Auslass des Entgasers nicht vollständig entgast. Pumpen Sie etwa 10 Minuten lang Lösungsmittel mit der gewünschten Flussrate durch das System, bevor Sie eine Analyse starten. Dies ermöglicht die vollständige Entgasung des Lösungsmittels im Vakuumentgaser.

1. Öffnen Sie das Spülventil der Pumpe.
2. Stellen Sie die Flussrate auf 5 mL/min.
3. Wählen Sie Kanal A1.
4. Schalten Sie den Eluentendurchfluss ein.
5. Überprüfen Sie, ob sich das Lösungsmittel im Schlauch von Kanal A1 in Richtung Pumpe bewegt. Ist dies nicht der Fall, trennen Sie den Lösungsmittelschlauch vom Lösungsmittelauswahlventil, schließen Sie eine Spritze über einen Spritzenadapter an und ziehen Sie die Flüssigkeit durch den Entgaser. Schließen Sie dann wieder den Schlauch am Lösungsmittelauswahlventil an.
6. Pumpen Sie 30 mL Isopropanol, um verbleibende Luftblasen zu entfernen.
7. Wechseln Sie zum nächsten Lösungsmittelkanal und wiederholen Sie die Schritte 5 und 6, bis alle Kanäle gespült sind.
8. Schalten Sie den Fluss ab und schließen Sie das Spülventil.

Regelmäßiges Spülen

Wann erforderlich

Bei einem längeren Stillstand des Pumpensystems (z. B. über Nacht) gelangt Sauerstoff in den Lösungsmittelkanal zwischen Vakuumentgaser und Pumpe. Wenn Lösungsmittel mit flüchtigen Bestandteilen ohne Flussbewegung für einen längeren Zeitraum im Entgaser verbleiben, kommt es zu einem leichten Verlust der flüchtigen Bestandteile.

Vorbereitungen

Schalten Sie das System ein.

HINWEIS

Das Spülwerkzeug von Lab Advisor kann verwendet werden, um die Pumpe automatisch zu spülen.

1. Öffnen Sie das Spülventil an Ihrer Pumpe durch Drehen gegen den Uhrzeigersinn und wählen Sie eine Durchflussrate von 5 mL/min.
2. Spülen Sie den Vakuumentgaser und alle Schläuche mit mindestens 10 mL Lösungsmittel.
3. Wiederholen Sie Schritt 1 und 2 für den/die anderen Kanal/Kanäle der Pumpe.
4. Stellen Sie die gewünschte Eluentenzusammensetzung und Flussrate für Ihre Analysenanwendung ein und schließen Sie das Spülventil.
5. Pumpen Sie für ca. 10 Minuten Lösungsmittel durch Ihr System, bevor Sie Ihre Anwendung starten.

Lösungsmittelwechsel

Wann erforderlich

Wenn das Lösungsmittel eines Kanals gegen ein anderes, nicht kompatibles Lösungsmittel ausgetauscht werden soll (die Lösungsmittel sind nicht mischbar oder ein Lösungsmittel beinhaltet einen Puffer), muss das unten beschriebene Verfahren befolgt werden, um ein Verstopfen der Pumpe durch Salzausfällung oder verbleibende Flüssigkeitströpfchen in Systemteilen zu verhindern.

Erforderliche Teile

Anzahl	Best.-Nr.	Beschreibung
1		Lösungsmittel zum Spülen, siehe Tabelle 8 auf Seite 84
1	5022-2184	ZDV-Verbindungsstück

Vorbereitungen

Entfernen Sie die Säule und ersetzen Sie diese durch eine ZDV-Verschraubung

Stellen Sie Flaschen mit geeigneten Zwischenlösungsmitteln (siehe Tabelle 8 auf Seite 84) bereit.

1. Falls der Kanal nicht mit Pufferlösung gefüllt ist, fahren Sie mit Schritt 4 fort.
2. Stellen Sie den Lösungsmittel-Ansaugfilter in eine Flasche Wasser.
3. Spülen Sie den Kanal mit einer für die installierten Schläuche geeigneten Flussrate (normalerweise 3 – 5 mL/min) während 10 Minuten.
4. Verändern Sie den Flussweg Ihres Systems je nach Anforderung Ihrer Anwendung.

VORSICHT

Puffersalze von wässrigen Puffern können residuales Isopropanol ausfällen.

Durch ausgefälltes Salz können Kapillaren und Filter verstopfen.

➔ Spülen Sie Lösungsmittelleitungen mit hoher Salzkonzentration zuerst mit Wasser, bevor Sie organische Lösungsmittel einfüllen.

➔ Führen Sie die Schritte 5 bis 7 nicht für Kanäle durch, die wässrige Pufferlösung enthalten.

5. Ersetzen Sie die Lösungsmittelflasche durch eine Flasche Isopropanol.
6. Spülen Sie den Kanal mit einer für die installierten Schläuche geeigneten Flussrate (normalerweise 3 – 5 mL/min) während 5 Minuten.
7. Ersetzen Sie die Flasche Isopropanol durch eine Flasche mit dem Lösungsmittel für Ihre Anwendung.

8 Wiederholen Sie die Schritte 1 bis 7 für den/die anderen Kanal/Kanäle der Pumpe.

9 Installieren Sie die gewünschte Säule, stellen Sie die erforderliche Eluentenzusammensetzung und die Durchflussrate für Ihre Analysenanwendung ein und äquilibrieren Sie das System für etwa 10 Minuten, bevor Sie einen Analysenlauf starten.

Tabelle 8 Auswahl von Lösungsmitteln zum Erstbetrieb für verschiedene Zwecke

Zeitpunkt	Lösungsmittel	Anmerkungen
Nach einer Installation	Isopropanol	Bestes Lösungsmittel zum Entfernen von Luft aus dem System
Beim jeweiligen Wechsel zwischen Normalphase und Umkehrphase	Isopropanol	Mit fast allen Lösungsmitteln mischbar
Nach einer Installation	Ethanol oder Methanol	Als Alternative und zweite Wahl anstelle von Isopropanol, wenn dieses nicht zur Verfügung steht
Zur Reinigung des Systems beim Einsatz von Pufferlösungen	HPLC-Wasser	Bestes Lösungsmittel zum erneuten Lösen auskristallisierter Puffersalze
Nach dem Wechsel von wässrigen Lösungsmitteln	HPLC-Wasser	Bestes Lösungsmittel zum erneuten Lösen auskristallisierter Puffersalze
Nach der Installation von Dichtungen für Normalphasen (PE-Dichtungen (Packung mit 2 Stück) (0905-1420))	Hexan + 5 % Isopropanol	Gute Befeuchtungseigenschaften

5 Schnellstart-Anleitung

Über die Schnellstart-Anleitung 86
Vorbereitung des Systems 87
- EIN-Schalten des Systems 87
- Laden der Standardmethode 88
- Konfigurieren des Online-Plot 89
- Spülen der Pumpe 91

Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle 92
- Methodenparameter für den Systemtest mit der isokratischen Testprobe 92
- Einrichtung der Methode 96
- Ausführen der Methode mit einer einzelnen Injektion 98

Datenanalyse 100
- Ansicht Datenanalyse 101
- Integrieren eines Signals 102
- Spezifizieren des Berichts 103

Dieses Kapitel enthält Informationen zur Datenerfassung und Datenanalyse mit dem Binären LC 1260 Infinity.

Über die Schnellstart-Anleitung

Dieses Kapitel enthält Informationen zum Betrieb des Binären LCs Agilent 1260 Infinity. Sie kann als Anleitung für die schnelle Durchführung einer ersten Analyse nach der Installation verwendet werden und gleichermaßen zur Übung wie auch zur ersten Übersicht über die Funktion des Systems insgesamt dienen. Sie enthält außerdem ausführlichere Informationen über die Methodenparameter.

Dieses Beispiel erläutert die Einrichtung einer Methode und die Durchführung einer Analyse mit den Säulen und der Testprobe, die mit dem Binären LC 1260 Infinity geliefert werden. Das Beispiel bezieht sich auf Menüs und Befehle in der OpenLAB CDS ChemStation Edition, jedoch sind identische Funktionen auch bei den alternativen Steuerungsoptionen wie der OpenLAB CDS EZChrom Edition und der MassHunter-Software verfügbar.

Im Folgenden beziehen sich die Begriffe ChemStation bzw. EZChrom immer auf die Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition bzw. die Agilent OpenLAB CDS EZChrom Edition.

HINWEIS

Damit begonnen werden kann, sollte das System installiert, eingeschaltet und initialisiert sein (siehe "Anfangsspülung" auf Seite 80). Die UV-Lampe sollte mindestens 30 Minuten vor Beginn der quantitativen Analyse eingeschaltet worden sein.

Vorbereitung des Systems

EIN-Schalten des Systems

Wenn das System nicht bereits eingeschaltet und die Software im Betriebszustand Ready ist, führen Sie diese Schritte durch:

1 Schalten Sie das Computer-System ein und warten Sie, bis der Windows Desktop angezeigt wird.

2 Schalten Sie die Stromversorgung der LC-Module mit dem Schalter links unten an den einzelnen Modulen ein.

In der Mitte des Schalters leuchtet ein grünes Kontrolllicht auf.

3 Starten Sie die Steuerungssoftware auf dem Computer durch Klicken auf das entsprechende Symbol (wenn konfiguriert). Alternativ können Sie **Start > All Programs > Agilent Technologies > OpenLAB > OpenLAB Control Panel** wählen. Wählen Sie im Navigationsfenster unter **Instruments** das entsprechende Gerät und klicken Sie auf **Launch online**.

Die ChemStation-Software wird in der Ansicht **Method and Run Control** gestartet. Die Module befinden sich anfangs im Modus Standby und Not Ready, ausgenommen der automatische Probengeber, der sofort initialisiert wird und in den Modus Ready übergeht.

4 Um jedes Modul einzeln einzuschalten, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das entsprechende Symbol und wählen Sie **Switch [module name] on** aus dem Kontextmenü.

Alternativ dazu können Sie alle Module gleichzeitig einschalten, indem Sie auf die Schaltfläche **System On/Off** links unten im Systemdiagramm klicken. Der Systemstatus ändert sich, nach einer kurzen Wartezeit für das Erreichen der Gerätesollwerte, von *Not Ready* (gelbes Licht) nach *Ready* (grünes Licht).

Laden der Standardmethode

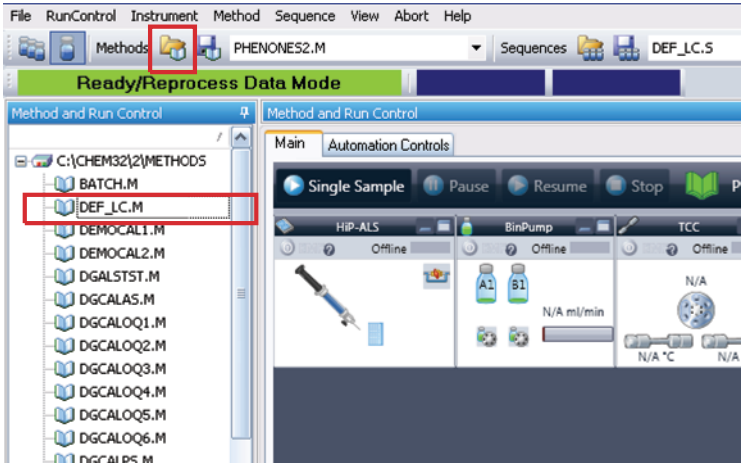
Die ChemStation bietet eine Standardmethode mit der Bezeichnung **DEF_LC.M**, die beim ersten Einschalten, oder wann immer eine neue leere Methodenvorlage erforderlich ist, geöffnet wird. Sie enthält Standardeinstellungen für alle Module.

Mit diesem Verfahren laden Sie die Methode **DEF_LC.M**. Sie können sie zum Einstellen sämtlicher Parameter auf die Standardwerte benutzen oder als Methodenvorlage für die Einrichtung einer neuen Methode.

1 Rufen Sie die Ansicht **Method and Run Control** der ChemStation auf.

2 Wählen Sie in der Menüleiste **Method** > **New Method...** und wählen Sie anschließend **DEF_LC.M** aus dem Kontextmenü.

   Alternativ dazu können Sie das Symbol **Load Method** unter der Menüleiste verwenden oder Sie können auf den Methodennamen **DEF_LC.M** auf der Registerkarte **Methods** im Navigationsfenster doppelklicken.



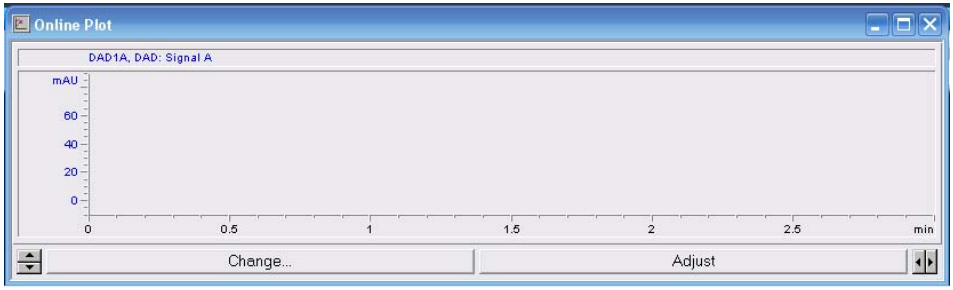
Die Standardmethode (**DEF_LC.M**) bietet einen Satz Standardparameter, die zur Einrichtung einer neuen Methode modifiziert werden können. Beispielsweise ist die Flussrate auf null gesetzt und die **Method Information** und die **Method History** sind leer.

HINWEIS

Beachten Sie, dass diese Methode nicht mit neuen Parametern überschrieben werden kann. Klicken auf **Save** führt daher direkt zur Funktion **Save As...**, so dass Sie einen neuen Methodennamen eingeben müssen.

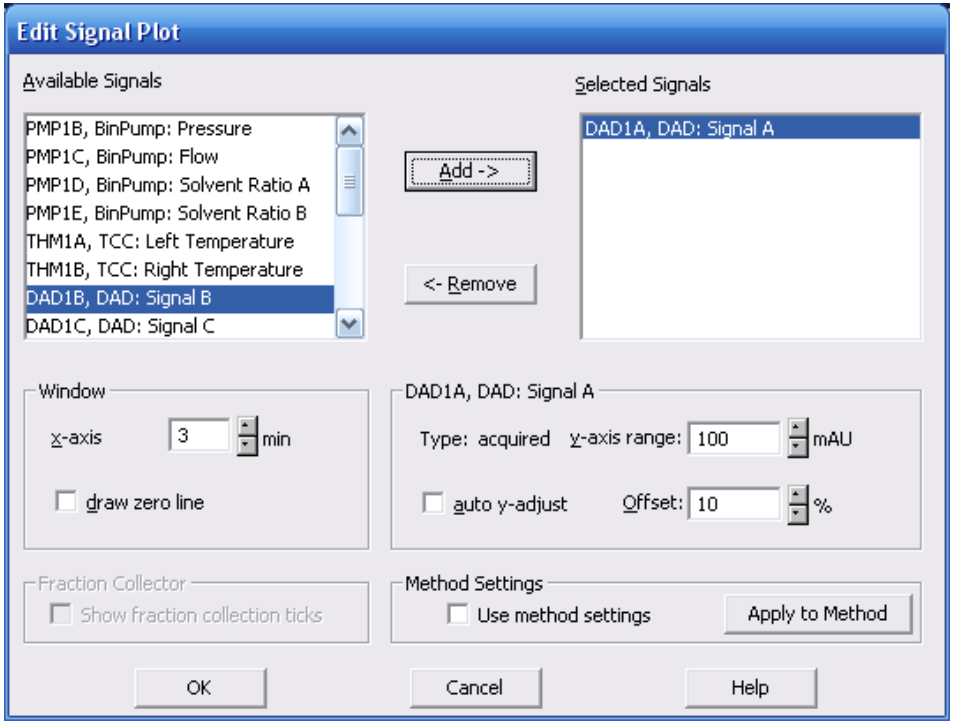
Konfigurieren des Online-Plot

1 Wenn das Fenster **Online Plot** nicht sichtbar ist: Klicken Sie auf **View > Online Signals > Signal Window 1**, um das Fenster einzublenden.



2 Zum Konfigurieren der gewünschten Signale im Fenster **Online Plot** klicken Sie auf **Change...**.

Die Einrichtungsseite **Edit Signal Plot** wird geöffnet.



3 Markieren Sie im Feld **Available Signals** die gewünschten Signale und klicken Sie auf **Add**, um sie in das Feld **Selected Signals** zu transferieren.

4 Zum Konfigurieren der einzelnen Einstellung für jedes Signal markieren Sie das Signal im Feld **Selected Signal** und geben Sie die erforderlichen Werte in der unteren Hälfte der Seite ein.

HINWEIS Zusätzlich zu den Detektorsignale können auch Parameter wie die Temperatur und der Druck geplottet werden. Mit der Schaltfläche **Apply to Method** können die Einstellungen auf dieser Seite in der Methode gespeichert werden.

Das Fenster **Online Plot** verhält sich wie eine elektronische Flip-Chart und gibt kontinuierlich die vom Detektor/von den Detektoren ausgegebenen Werte und andere Ausgabeparameter wieder. Die Signale werden rechts im Fenster gezeichnet und bewegen sich nach links. Bis zu 90 min zurückliegender Daten sind zugänglich. Dies ist nützlich für die Überprüfung der Basislinie und für Vergleiche mit vorangegangenen Injektionen. Die X- und die Y-Achse können mit den Auf/Ab-Schaltflächen an jeder Achse direkt angepasst werden.

Mit der Schaltfläche **Adjust** im **Online Plot**-Fenster lässt sich der aktuelle Punkt des ausgewählten Signals zur Nulllinie bewegen. Das ausgewählte Signal wird durch die Farbe der Y-Achsenbeschriftung angezeigt. Ein spezielles Signal kann durch Klicken auf das Signal oder durch Klicken auf die entsprechende Signalbeschreibung oben im Plot ausgewählt werden.

Durch Drücken der Schaltfläche **Balance** werden alle Detektoren auf null gesetzt.

HINWEIS Auf der Seite **Online Plot** vorgenommene Änderungen wirken sich nicht auf die in den einzelnen Datendateien gespeicherten Daten aus.

Spülen der Pumpe

Spülen Sie die Pumpe, wenn ...

- die Pumpe zum ersten Mal initialisiert wurde,
- die Pumpe vor Verwendung des Systems mit frischem Lösungsmittel gespült werden soll oder wenn das Lösungsmittel gegen ein anderes ausgetauscht werden soll;
- die Pumpe einige Stunden oder länger nicht in Betrieb war (möglicherweise ist Luft in die Lösungsmittelleitungen hineindiffundiert, so dass Spülen empfehlenswert ist).
- die Lösungsmittelbehälter neu gefüllt werden und die Pumpe gespült werden muss, damit das System mit dem frischen Lösungsmittel gefüllt werden kann; Wenn unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden sollen, stellen Sie sicher, dass das neue Lösungsmittel mit dem alten mischbar ist und fügen Sie nötigenfalls einen Zwischenschritt mit einem mischbaren Lösungsmittel ein (Isopropanol ist meist eine gute Wahl; ziehen Sie eine Löslichkeitstabelle zu Rate).

Weitere Einzelheiten zum Spülverfahren finden Sie unter “Regelmäßiges Spülen” auf Seite 82.

Datenerfassung in der Ansicht Methoden- und Analysenkontrolle

Methodenparameter für den Systemtest mit der isokratischen Testprobe

Um den Binären LC 1260 Infinity zu testen, erfolgt ein Testlauf mit einem isokratischen Testgemisch (Agilent isokratische Testprobe (01080-68704)) auf der Säule, die mit Ihrem System bestellt und geliefert wurde.

Agilent isokratische Testprobe (01080-68704) enthält die folgenden Komponenten, in Methanol gelöst:

- Dimethylphthalat
- Diethylphthalat
- Biphenyl
- o-Terphenyl

Die Methodenparameter für die Trennung dieses Testgemisches sind in Tabelle 9 auf Seite 93 für die Standardkonfiguration des Verzögerungsvolumens und in Tabelle 10 auf Seite 94 für die Konfiguration mit geringem Verzögerungsvolumen zusammengefasst.

Tabelle 9 Methodenparameter für die erste Trennung - Standardkonfiguration für Verzögerungsvolumen

Modul	Parameter	Einstellung
Pumpe	Lösungsmittel A	Wasser
	Lösungsmittel B	Acetonitril
	Flussrate	4,0 mL/min
	Lösungsmittelzusammensetzung	40 % A, 60 % B
	Stoppzeit	1 min (1 min Nachspülzeit)
Automatischer Probengeber	Injektion	1 µL
Säulenthermostat	Säule	• Säule Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm (959961-902) • Säule Poroshell 120 EC-C18, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm (699975-302) • Säule Poroshell 120 EC-C18, 4,6 x 50 mm, 2,7 µm (699975-902)
	Temperatur	40 °C
Detektor	Signal A	Wellenlänge: 250 nm, Bandbreite: 4 nm Referenzwellenlänge: 360 nm, Referenzbandbreite: 100 nm

Tabelle 10 Methodenparameter für die erste Trennung - Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen

Modul	Parameter	Einstellung
Pumpe	Lösungsmittel A	Wasser
	Lösungsmittel B	Acetonitril
	Flussrate	0,75 mL/min
	Lösungsmittelzusammensetzung	40 % A, 60 % B
	Stoppzeit	1,2 min (1 min Nachspülzeit)
Automatischer Probengeber	Injektion	1 µL
Säulenthermostat	Säule	Säule: SB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 µm, 600 bar (827975-902)
	Temperatur	40 °C
Detektor	Signal	Wellenlänge: 250 nm, Bandbreite: 4 nm Referenzwellenlänge: 360 nm, Referenzbandbreite: 100 nm

Testspezifikationen:

- im Chromatogramm sind vier Peaks zu sehen
- **Intensity Test** – bestanden
- **Wavelength Calibration**±1 nm

Testvorbereitung

1 Füllen Sie die Lösungsmittelflasche A mit HPLC-reinem Wasser. Füllen Sie die Lösungsmittelflasche B mit HPLC-reinem Acetonitril.

2 Spülen Sie jeden Kanal des Entgasers, falls installiert, mit Hilfe der mitgelieferten Spritze.

3 Öffnen Sie das Spülventil der Pumpe und spülen Sie jeden Kanal mit 5 mL/min.

   Dies sollte genügen, um vorhandene Luft aus dem System zu entfernen.

4 Setzen Sie die mitgelieferte Säule in den Säulenthermostaten ein.

5 Spülen Sie die Flusszelle 5 min lang mit HPLC-reinem Wasser.

6 Führen Sie, falls anwendbar, einen Wellenlängenkalibrierungs- und Intensitätstest durch.

7 Ermöglichen Sie eine Äquilibrierung des Systems unter den in Tabelle 9 auf Seite 93 und in Tabelle 10 auf Seite 94 angegebenen Testbedingungen während 10 min.

8 Bereiten Sie eine Probenflasche mit der isokratischen Testprobe vor.

Einrichtung der Methode

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die Methodenbedingungen für eine Analyse rasch eingestellt werden können.

Voraussetzungen

Die Standardmethode **DEF_LC.M** wurde geladen und ist bereit für die Vorbereitung der neuen Methode. Nun können zum Erstellen der neuen Methode die Schlüsselparameter bearbeitet werden.

1 Um rasch auf die Seite **Method** für die einzelnen Module zuzugreifen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Diagramm für das Modul und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

   Auf diese Weise werden alle Module eingerichtet.

2 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Pumpenbereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

   a Geben Sie auf der Seite **Method** für die **1260 Infinity Binary Pump** die folgenden Parameter ein:

   - Flussrate: 4,0 ml/min
   - Lösungsmittel A: Wählen Sie **Water** aus der Dropdown-Liste Kompressibilität.
   - Lösungsmittel B: Klicken Sie das Kontrollkästchen an, um Lösungsmittel B zu aktivieren.
   - Wählen Sie für %B den Wert 60 %
   - Stoppzeit: 1 min
   - Nachspülzeit: 1 min

   b Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

   Die Änderungen werden an das Pumpenmodul gesendet.

3 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Probengeberbereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

   a Geben Sie auf der Seite **Method** für den **1260 Infinity Autosampler** die folgenden Parameter ein:

   - Injektionsvolumen: 1,0 µl
   - Injektion mit Nadelreinigung
   - Modus Spülanschluss, Zeit: 6 s

b Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

Die Änderungen werden an das Probengebermodul gesendet.

4 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Säulenthermostatbereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

a Geben Sie auf der Seite **Method** für den **1290 Infinity TCC** die folgenden Parameter ein:

- Temperatursollwert links 40 °C
- Temperatur rechts Kombiniert

b Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

Die Änderungen werden an das TCC-Modul gesendet.

5 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Diodenarray-Detektor-Bereich und wählen Sie **Method...** aus dem Kontextmenü.

a Geben Sie auf der Seite **Method** für den **1260 Infinity DAD** die folgenden Parameter ein:

- **Use Signal**: Schalten Sie außer **Signal A** alle Signale aus, indem Sie die Häkchen in den entsprechenden Kontrollkästchen entfernen.
- Signal A: 254 nm, Bandbreite (bw) 4 nm, Referenz (ref) 550 nm, Bandbreite (bw) 100 nm
- Peakbreite: 0,02

b Im Abschnitt **Advanced** setzen Sie **Spectrum Store** auf **All**.

c Für die anderen Parameter können die Standardeinstellungen beibehalten werden. Klicken Sie zum Schließen des Fensters auf **OK**.

Die Änderungen werden an das DAD-Modul gesendet.

6 Nun sind alle erforderlichen Methodenparameter eingegeben. Wählen Sie **Method > Save Method As...** und geben Sie `ISO-1.M` ein, um die Methode unter einem neuen Namen zu speichern.

ChemStation lässt nicht zu, dass die Methode als **DEF_LC.M** gespeichert wird, damit die Standardmethodenvorlage nicht verändert wird.

7 Lassen Sie das System sich für mindestens 10 min äquilibrieren und prüfen Sie im **Online Plot**, ob die Basislinie stabil ist, bevor Sie die Analyse beginnen.

Ausführen der Methode mit einer einzelnen Injektion

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie eine einzelne Injektion der isokratischen Testprobe unter Verwendung der im vorigen Abschnitt eingegebenen Bedingungen analysiert wird.

Analysen mit der ChemStation können in zwei Modi ausgeführt werden:

- **Run Method**: einzelne Injektionen, zum Beispiel bei der interaktiven Methodenentwicklung unter Verwendung der aktuellen Einstellungen;
- **Run Sequence**: automatische Serie von Injektionen aus mehreren Flaschen, evtl. mit mehreren Methoden. Weitere Einzelheiten finden Sie in den ChemStation-Handbüchern.

1 Klicken Sie auf das Symbol **Select Run Method Task** .

2 Wenn die erforderlichen Methodenbedingungen aktuell nicht geladen sind,

wählen Sie **Method > Load Method** oder das Symbol unter der Menüleiste, um sie zu laden.

HINWEIS

Wenn Änderungen vorgenommen wurden, die noch nicht gespeichert sind, wird dies durch ein gelbes Sternchen am Symbol Methodenstatus angezeigt. Die Injektion kann ohne vorheriges Speichern der Parameteränderungen vorgenommen werden. Die ChemStation speichert stets eine Kopie der Aufnahmeparameter in der Datendatei als ACQ.TXT, um sicherzustellen, dass die ursprünglichen Methodenparameter erhalten bleiben.

3 Setzen Sie die Probenflasche in Position 1. Dies ist die vordere von den 10 Positionen für 2 ml-Flaschen auf der rechten Seite des Probentellers.

4 wählen Sie **Run Control > Sample Info** und geben Sie die erforderlichen Probenparameter ein.

Zum Beispiel:

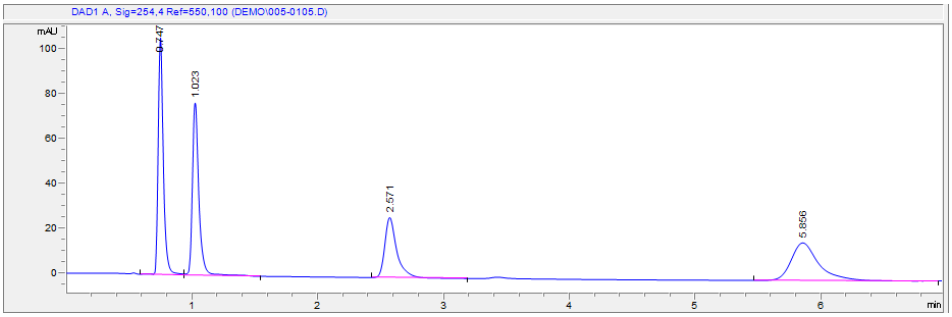
- **Subdirectory** (optional)
- **Name Pattern**
- **Vial/Location**
- **Sample name**
- **Comment**

5 Wenn das System bereits äquilibriert und die Basislinie stabil ist, klicken Sie auf **Run Method** auf der Seite **Sample Info**, um die Injektion zu starten.

Alternativ dazu können Sie auf **OK** klicken und danach die Option **Run Control > Run Method** wählen. Die Aufgabe wird zur **Run Queue** hinzugefügt und von dort aus automatisch gestartet.

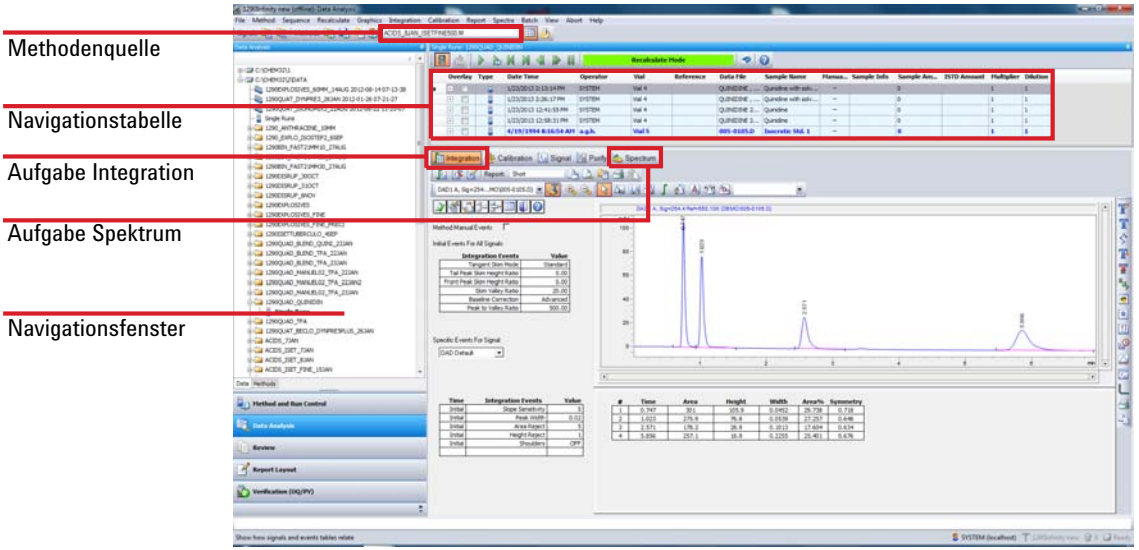
6 Die Injektion wird durchgeführt und das Chromatogramm wird im **Online Plot** angezeigt. Die Datenerfassung wird beendet, wenn die **Stop Time** erreicht ist.

Das Chromatogramm sollte etwa wie das nachstehend Abgebildete aussehen:



Datenanalyse

Eine Methode in der ChemStation enthält alle Parameter für die Datenerfassung (Steuerung des Systems) und die Datenanalyse (Verarbeitung der Daten, um quantitative und qualitative Ergebnisse zu erhalten). In diesem Abschnitt wird kurz auf Integration und Berichte eingegangen, so dass die zuvor erstellten Chromatogramme integriert und gedruckt werden können. Ausführlichere Informationen zur Datenanalyse, einschließlich der Verwendung der Kalibrierung zur Quantifizierung, finden Sie im ChemStation-Handbuch.



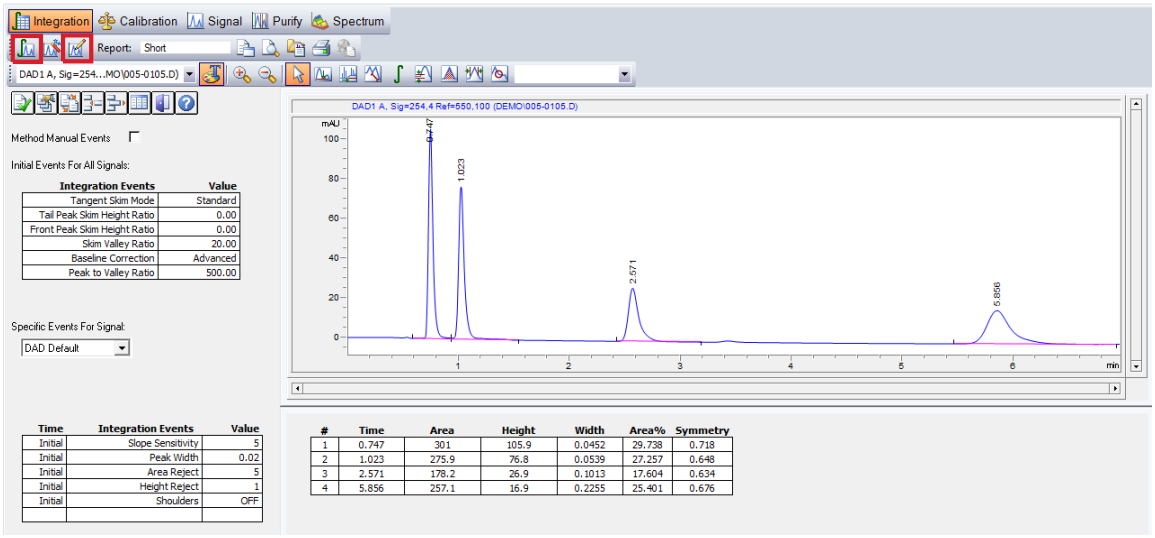
Ansicht Datenanalyse

So wird ein Chromatogramm in der Ansicht Data Analysis geöffnet:

1. Starten Sie eine offline befindliche ChemStation.
2. Klicken Sie auf **Data Analysis** unten links auf dem Bildschirm.
3. Suchen Sie im Navigationsfenster das Datenverzeichnis mit den Datendateien. Alle Daten zu einzelnen Injektionen sind als Untergruppe unter **Single Runs** repräsentiert. Doppelklicken Sie auf **Single Runs**, um diese Datendateien in die Navigationstabelle zu laden.
4. Wählen Sie eine Datei in der Navigationstabelle und doppelklicken Sie darauf, um das Chromatogramm in die Ansicht zu laden.

Integrieren eines Signals

1 Wählen Sie das Aufgabenwerkzeug Integration (siehe nachstehende Abbildung). Die Symbole **Integrate** und **Set Integration Events Table** sind in der nachstehenden Abbildung markiert.



2 Klicken Sie auf das Symbol **Set Integration Events Table**, um die Tabelle wie gezeigt zu öffnen.

3 Setzen Sie die **Baseline Correction** für Analysen auf **Advanced**.

4 Setzen Sie die **Slope Sensitivity** auf 5 .

Bei höheren Werten werden steilere Peaks integriert und weniger steile ignoriert.

5 Setzen Sie den Wert für die **Peak Width** auf die Breite des schmalsten relevanten Peaks, in diesem Fall etwa 0,02 .

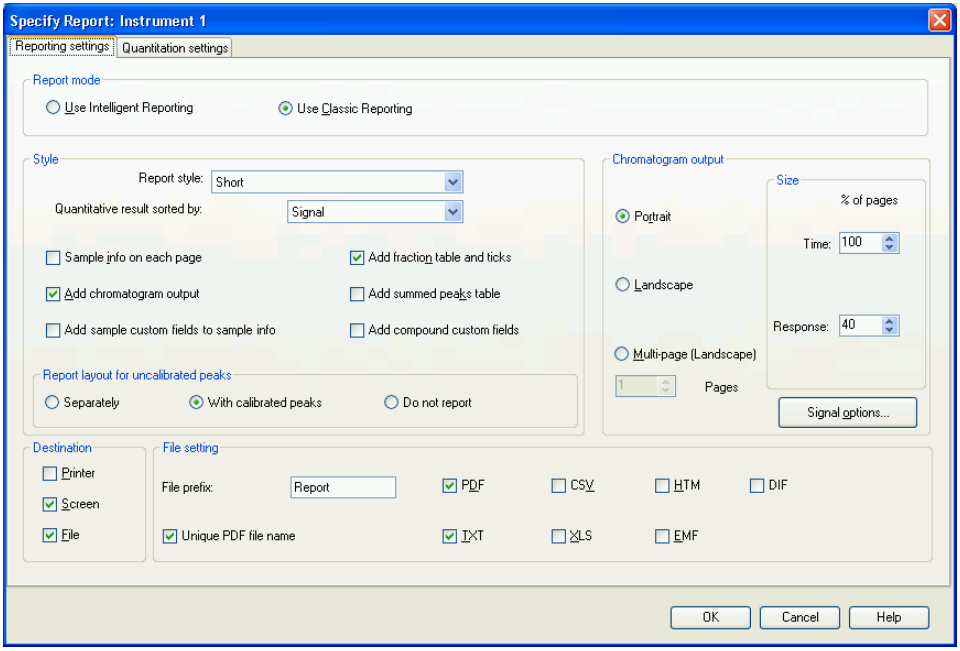
6 **Area Reject** und **Height Reject** können so eingestellt werden, dass die kleinsten Peaks zurückgewiesen werden.

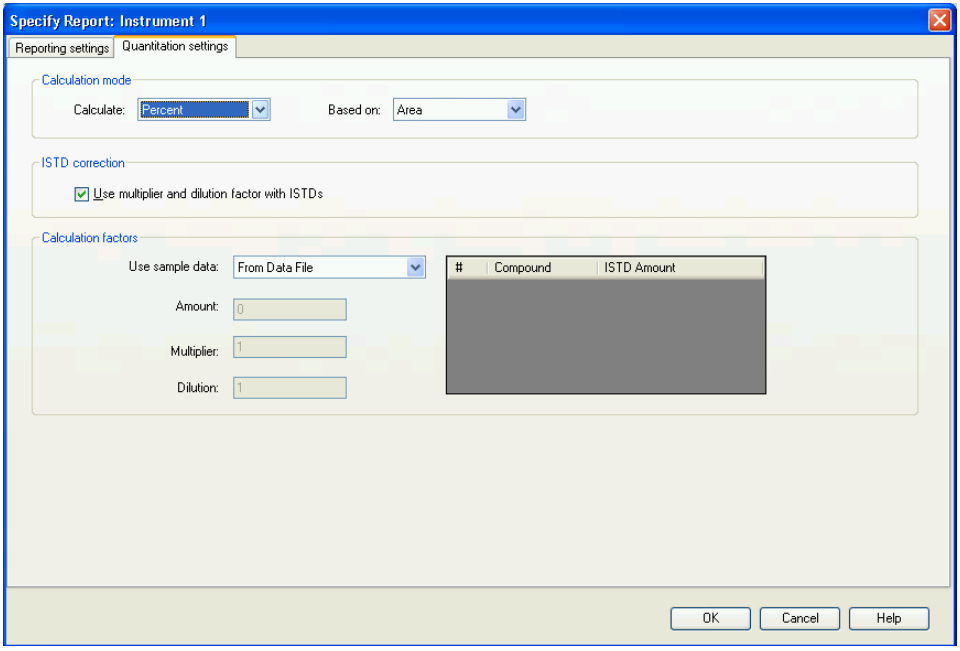
7 Klicken Sie auf das Symbol **Integrate**, um die Ergebnisse mit diesen neuen Einstellungen zu aktualisieren.

8 Schließen Sie die **Integration Events** mit dem grünen Häkchen-Symbol .

Spezifizieren des Berichts

1 Klicken Sie in der Menüleiste auf **Report > Specify Report**, um das in der nachstehenden Abbildung gezeigte Fenster zu öffnen.





2 Mit den in den Abbildungen weiter oben gezeigten Beispieleinstellungen können Sie einen Flächenprozentbericht der Peaks erstellen.

3 Im Abschnitt **Destination** wählen Sie **Printer** um einen Papierausdruck zu erhalten bzw. **File** und **PDF**, um eine nützliche PDF-Berichtdatei in der Datendatei zu speichern (die Datendatei mit der Dateinamenerweiterung ist eigentliche ein .D Verzeichnis. Die Berichtdatei kann direkt auf den ChemStation angezeigt werden oder sie kann im Verzeichnis mit dem Windows Explorer gefunden werden).

4 Speichern Sie die Methode noch einmal, um sicherzustellen, dass die Berichteinstellung für die zukünftigen Verwendung durch die Methode zur Verfügung stehen.

   Wenn die Methode wieder verwendet wird, werden diese Integrationsereignisse und Berichteinstellungen zum Erstellen des Berichts verwendet.

Dieser Abschnitt schließt die kurze Übersicht über den Datenanalyse-Teil der ChemStation-Software ab. Weitere Informationen zu den vielfältigen Funktionen der ChemStation finden Sie in den ChemStation-Handbüchern und in der Online-Hilfe.

6
Anhang

Sicherheitsinformationen 106
Informationen zu Lösungsmitteln 109
Materialinformation 109
Agilent Technologies im Internet 114
Einrichtung einer Methode mithilfe von Ganze Methode bearbeiten 115
Methodeninformationen 117
Gerät/Aufnahme 118
Datenanalyse 135
Laufzeit-Checkliste 142

Dieses Kapitel enthält ergänzende Informationen zur Sicherheit, zum Internet, zur Einrichtung einer Methode sowie rechtliche Hinweise.

Sicherheitsinformationen

Allgemeine Sicherheitsinformationen

Die folgenden allgemeinen Sicherheitshinweise müssen in allen Betriebsphasen sowie bei der Wartung und Reparatur des Geräts beachtet werden. Die Nichtbeachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen bzw. der speziellen Warnungen innerhalb dieses Handbuchs verletzt die Sicherheitsstandards der Entwicklung, Herstellung und vorgesehenen Nutzung des Geräts. Agilent Technologies übernimmt keine Haftung, wenn der Kunde diese Vorschriften nicht beachtet.

WARNUNG

Stellen Sie die ordnungsgemäße Verwendung der Geräte sicher.

Der vom Gerät bereitgestellte Schutz kann beeinträchtigt sein.

➔ Der Bediener sollte dieses Gerät so verwenden, wie in diesem Handbuch beschrieben.

Sicherheitsstandards

Dies ist ein Gerät der Sicherheitsklasse I (mit Erdungsanschluss). Es wurde entsprechend internationaler Sicherheitsstandards gefertigt und getestet.

Betrieb

Beachten Sie vor dem Anlegen der Netzspannung die Installationsanweisungen. Darüber hinaus sind folgende Punkte zu beachten:

Während des Betriebs darf das Gehäuse des Geräts nicht geöffnet werden. Vor dem Einschalten des Gerätes müssen sämtliche Massekontakte, Verlängerungskabel, Spartransformatoren und angeschlossenen Geräte über eine geerdete Netzsteckdose angeschlossen werden. Bei einer Unterbrechung des Erdungsanschlusses besteht die Gefahr eines Stromschlags, der zu ernsthaften Personenschäden führen kann. Das Gerät muss außer Betrieb genommen und gegen jede Nutzung gesichert werden, sofern der Verdacht besteht, dass die Erdung beschädigt ist.

Stellen Sie sicher, dass nur Sicherungen für entsprechenden Stromfluss und des angegebenen Typs (normal, träge usw.) als Ersatz verwendet werden. Die Verwendung reparierter Sicherungen und das Kurzschließen von Sicherungshaltern sind nicht zulässig.

Einige in diesem Handbuch beschriebenen Einstellarbeiten werden bei an das Stromnetz angeschlossenem Gerät und abgenommener Gehäuseabdeckung durchgeführt. Dabei liegen im Gerät an vielen Punkten hohe Spannungen an, die im Falle eines Kontaktschlusses zu Personenschäden führen können.

Sämtliche Einstellungs-, Wartungs- und Reparaturarbeiten am geöffneten Gerät sollten nach Möglichkeit nur durchgeführt werden, wenn das Gerät von der Netzspannung getrennt ist. Solche Arbeiten dürfen nur von erfahrenem Personal durchgeführt werden, das über die Gefahren ausreichend informiert ist. Wartungs- und Einstellarbeiten an internen Gerätekomponenten sollten nur im Beisein einer zweiten Person durchgeführt werden, die im Notfall Erste Hilfe leisten kann. Tauschen Sie keine Komponenten aus, solange das Netzkabel am Gerät angeschlossen ist.

Das Gerät darf nicht in Gegenwart von brennbaren Gasen oder Dämpfen betrieben werden. Ein Betrieb von elektrischen Geräten unter diesen Bedingungen stellt immer eine eindeutige Gefährdung der Sicherheit dar.

Bauen Sie keine Austauschteile ein und nehmen Sie keine nicht autorisierten Veränderungen am Gerät vor.

Kondensatoren in diesem Gerät können noch geladen sein, obwohl das Gerät von der Netzversorgung getrennt worden ist. In diesem Gerät treten gefährliche Spannungen auf, die zu ernsthaften Personenschäden führen können. Die Handhabung, Überprüfung und Einstellung des Gerätes ist mit äußerster Vorsicht auszuführen.

Beachten Sie bei der Handhabung von Lösungsmitteln die geltenden Sicherheitsvorschriften (z. B. das Tragen von Schutzbrille, Handschuhen und Schutzkleidung), die in den Sicherheitsdatenblättern des Herstellers beschrieben sind, speziell beim Einsatz von giftigen oder gesundheitsgefährlichen Lösungsmitteln.

Sicherheitssymbole

Tabelle 11 Sicherheitssymbole

Symbol	Beschreibung
	Ist ein Bauteil mit diesem Symbol gekennzeichnet, so sollte der Benutzer zur Vorbeugung von Verletzungen und Beschädigungen die Bedienungsanleitung genau beachten.
	Weist auf gefährliche Spannungen hin.
	Weist auf einen Schutzkontakt (Erdung) hin.
	Das Licht der Deuterium-Lampe in diesem Produkt kann bei direktem Blickkontakt zu Augenverletzungen führen.
	Das Gerät ist mit diesem Symbol versehen, wenn heiße Oberflächen vorhanden sind, mit denen der Benutzer nicht in Berührung kommen sollte.

WARNUNG

Eine WARNUNG

weist Sie auf Situationen hin, die Personenschäden oder tödliche Verletzungen verursachen können.

➔ Übergehen Sie nicht diesen Hinweis, bevor Sie die Warnung nicht vollständig verstanden haben und entsprechende Maßnahmen getroffen haben.

VORSICHT

Der Sicherheitshinweis VORSICHT

weist Sie auf Situationen hin, die zu einem möglichen Datenverlust oder zu einer Beschädigung des Geräts führen können.

➔ Fahren Sie bei einem Vorsicht-Hinweis erst dann fort, wenn Sie ihn vollständig verstanden und entsprechende Maßnahmen getroffen haben.

Informationen zu Lösungsmitteln

Beachten Sie die folgenden Empfehlungen bei der Wahl der Lösungsmittel.

- Beachten Sie die Empfehlungen zur Verhinderung von Algenwachstum, siehe Pumpenhandbücher.
- Kleine Partikel können die Kapillarleitungen und Ventile dauerhaft verstopfen. Filtern Sie Lösungsmittel daher immer mit 0,4 µm-Filtern.
- Vermeiden oder minimieren Sie die Verwendung von Lösungsmitteln, die zur Korrosion von Elementen des Flusswegs führen können. Beachten Sie die Spezifikationen des pH-Bereichs für die unterschiedlichen Materialien wie Flusszellen, Ventilmaterialien usw. und die Empfehlungen in den nachstehenden Abschnitten.

Materialinformation

Gemäß der jahrzehntelangen Erfahrung von Agilent in der Entwicklung von hochwertigen Geräten für die HPLC-Analyse wurden die Materialien im Flussweg sorgfältig ausgewählt. Diese Materialien weisen unter typischen HPLC-Bedingungen eine hervorragende Stabilität auf. In Bezug auf spezielle Bedingungen informieren Sie sich bitte im Abschnitt Materialinformationen oder wenden Sie sich an Agilent.

Haftungsausschluss

Die folgenden Informationen wurden externen Quellen entnommen und sollen als Referenz dienen. Agilent übernimmt keine Garantie für die Richtigkeit und Vollständigkeit dieser Informationen. Die Informationen basieren auf Kompatibiblitätsbibliotheken, die nicht speziell dazu geeignet sind, die langfristige Nutzungsdauer unter den speziellen, aber höchst variablen Bedingungen von HPLC-Systemen, Lösungsmitteln, Lösungsmittelgemischen und Proben abzuschätzen. Wegen der katalytischen Wirkung von Verunreinigungen wie Metallionen, Komplexierungsmitteln, Sauerstoff usw. können die Informationen auch nicht verallgemeinert werden. Neben der rein chemischen Korrosion müssen auch andere Effekte wie Elektrokorrosion, elektrostatische Aufladung (insbesondere bei nichtleitenden organischen Lösungsmitteln), Aufquellen von Poly-

merteilen usw. beachtet werden. Die meisten verfügbaren Daten beziehen sich auf Raumtemperatur (typischerweise 20 – 25 °C, 68 – 77 °F). Falls Korrosion möglich ist, wird sie in der Regel durch höhere Temperaturen beschleunigt. Im Zweifelsfall informieren Sie sich bitte in der technischen Literatur über die chemische Kompatibilität der Materialien.

PEEK

PEEK (Polyetheretherketon) kombiniert hervorragende Eigenschaften in Bezug auf chemische Widerstandsfähigkeit sowie mechanische und thermische Stabilität. Es ist in einem pH-Bereich von 1 bis12,5 stabil und gegenüber vielen gebräuchlichen Lösungsmitteln inert. Bekannt ist eine Inkompatibilität mit Chemikalien wie Chloroform, Methylenchlorid, THF, DMSO > 1 %, starken Säuren (Salpetersäure > 10 %, Schwefelsäure > 10 %, Trichloressigsäure, Sulfonsäuren), Halogenen oder wässrigen Halogenlösungen, Phenol und seinen Derivaten (Kresole, Salicylsäure usw.). Wenn es oberhalb Raumtemperatur verwendet wird, ist PEEK empfindlich gegen Basen und verschiedene organische Lösungsmittel, die es quellen lassen können.

Polyimid

Agilent verwendet für Rotordichtungen in Ventilen und Nadelsitzen in automatischen Probengebern semikristallines Polyimid. Ein Hersteller von Polyimid ist DuPont, der Polyimid unter dem Markennamen Vespel vertreibt, das auch von Agilent verwendet wird.

Polyimid ist in einem pH-Bereich zwischen 1 und 10 sowie in den meisten organischen Lösungsmitteln stabil. Es ist inkompatibel mit konzentrierten Mineralsäuren (z. B. Schwefelsäure), Eisessig, DMSO und THF. Außerdem wird es durch nukleophile Substanzen wie Ammoniak (z. B. Ammoniumsalze unter basischen Bedingungen) oder Acetate abgebaut.

Polyethylen (PE)

Agilent verwendet Gemische aus ultrahochmolekularem Polyethylen (UHMW-PE) und PTFE für die gelben Kolben- und Spüldichtungen in den 1290 Infinity Pumpen und für Normalphasenanwendungen in den 1260 Infinity Pumpen.

Polyethylen besitzt eine gute Stabilität gegenüber den meisten gebräuchlichen anorganischen Lösungsmitteln einschließlich Säuren und Basen in einem pH-Bereich von 1 bis 12,5 . Es ist mit vielen organischen Lösungsmitteln kom-

patibel, die in Chromatographiesystemen verwendet werden, beispielsweise Methanol, Azetonitril und Isopropanol. Gegenüber aliphatischen, aromatischen und halogenierten Kohlenwasserstoffen, THF, Phenol und seinen Derivaten sowie konzentrierten Säuren und Basen besitzt es eine eingeschränkte Stabilität. Bei Normalphasenanwendungen sollte der Maximaldruck auf 200 bar beschränkt werden.

Tantal (Ta)

Tantal ist gegenüber den meisten gebräuchlichen HPLC-Lösungsmitteln und nahezu allen Säuren inert. Eine Ausnahme bilden Fluorwasserstoffsäure und Säuren mit freiem Schwefeltrioxid. Durch starke Basen (z. B. Hydroxidlösungen > 10 %, Diethylamin) kann es korrodiert werden. Es wird nicht für die Verwendung mit Fluorwasserstoffsäure und Fluoriden empfohlen.

Edelstahl

Edelstahl ist inert gegen viele gebräuchliche Lösungsmittel. Er ist gegenüber Säuren und Basen in einem pH-Bereich von 1 bis 12,5 stabil. Bei einem pH-Wert unter 2,3 kann er von Säuren angegriffen werden. Auch in den folgenden Lösungsmitteln kann eine Korrosion erfolgen:

- Lösungen von Alkalihalogeniden und deren jeweiligen Säuren (z. B. Lithiumiodid, Kaliumchlorid usw.) und wässrige Halogenlösungen.
- Hohe Konzentrationen anorganischer Säuren wie Salpetersäure, Schwefelsäure und organische Lösungsmittel, insbesondere bei höheren Temperaturen (sofern es die chromatographische Methode erlaubt, diese gegen Phosphorsäure oder Phosphatpuffer austauschen, die weniger korrodierend gegen Edelstahl sind).
- Halogenierte Lösungsmittel oder Gemische, die Radikale und/oder Säuren bilden, beispielsweise:

  $2\ CHCl_3 + O_2 \rightarrow 2\ COCl_2 + 2\ HCl$

  Diese Reaktion, die wahrscheinlich durch Edelstahl katalysiert wird, läuft in getrocknetem Chloroform schnell ab, wenn der Trocknungsprozess den als Stabilisator fungierenden Alkohol entfernt.
- Ether für die Chromatographie, welche Peroxide enthalten können (z. B. THF, Dioxan, Di-Isopropylether). Daher sollten diese über trockenem Aluminiumoxid, an dem die Peroxide adsorbiert werden, filtriert werden.

- Lösungen organischer Säuren (z. B. Essigsäure, Ameisensäure) in organischen Lösungsmitteln. So greift zum Beispiel eine Lösung von 1 % Essigsäure in Methanol Stahl an.
- Lösungen, die starke Komplexbildner enthalten (z. B. EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure).
- Mischungen von Tetrachlormethan mit 2-Propanol oder THF.

Diamantartiger Kohlenstoff (DLC)

Diamantartiger Kohlenstoff ist gegenüber nahezu allen gebräuchlichen Säuren, Basen und Lösungsmitteln inert. Es gibt keine dokumentierten Inkompatibilitäten für HPLC-Anwendungen.

Quarzglas und Quarz (SiO_2)

Quarzglas wird in den Flusszellen und Kapillaren des 1290 Infinity verwendet. Quarz wird für die klassischen Flusszellenfenster verwendet. Er ist inert gegenüber allen gebräuchlichen Lösungsmitteln und Säuren mit Ausnahme von Fluorwasserstoffsäure und sauren Lösungsmitteln, die Fluoride enthalten. Er wird durch starke Basen korrodiert und sollte bei Raumtemperatur nicht bei einem pH-Wert über 12 verwendet werden. Die Korrosion der Flusszellenfenster kann die Messergebnisse negativ beeinflussen. Für einen pH-Wert über 12 wird die Verwendung von Flusszellen mit Saphirfenstern empfohlen.

Gold

Im angegebenen pH-Bereich ist Gold gegenüber allen gebräuchlichen HPLC-Lösungsmitteln, Säuren und Basen inert. Es kann durch komplexierende Cyanide und konzentrierte Säuren wie Königswasser korrodiert werden.

Zirkoniumoxid (ZrO_2)

Zirkoniumoxid ist gegenüber nahezu allen gebräuchlichen Säuren, Basen und Lösungsmitteln inert. Es gibt keine dokumentierten Inkompatibilitäten für HPLC-Anwendungen.

Platinum/Iridium

Platin/Iridium ist gegenüber nahezu allen gebräuchlichen Säuren, Basen und Lösungsmitteln inert. Es gibt keine dokumentierten Inkompatibilitäten für HPLC-Anwendungen.

Fluorierte Polymere (PTFE, PFA, FEP, FFKM)

Fluorierte Polymere wie PTFE (Polytetrafluorethylen), PFA (Perfluoralkoxypolymer) und FEP (fluoriertes Ethylenpropylen) sind gegenüber nahezu allen gebräuchlichen Säuren, Basen und Lösungsmitteln inert. FFKM ist ein perfluorierter Kautschuk, der auch gegenüber den meisten Chemikalien beständig ist. Als Elastomer kann er in einigen organischen Lösungsmitteln, wie halogenierten Kohlenwasserstoffen, aufquellen.

Schläuche aus TFE/PDD-Copolymer, die in allen Agilent Entgasern mit Ausnahme des G1322A verwendet werden, sind nicht mit fluorierten Lösungsmitteln wie Freon, Fluorinert oder Vertrel kompatibel. Sie haben in Gegenwart von Hexafluorisopropanol (HFIP) eine begrenzte Lebensdauer. Um bei Verwendung von HFIP die höchstmögliche Lebensdauer zu erreichen, ist es am besten, für dieses Lösungsmittel eine separate Kammer zu reservieren, nicht zwischen den Lösungsmitteln zu wechseln und dafür zu sorgen, dass die Kammer nicht austrocknet. Für eine höchstmögliche Lebensdauer des Drucksensors sollten Sie kein HFIP in der Kammer belassen, wenn das Gerät ausgeschaltet ist.

Saphir, Rubin und Keramik auf Al_2O_3-Basis

Saphir, Rubin und Keramik auf der Basis von Al_2O_3 sind gegenüber nahezu allen gebräuchlichen Säuren, Basen und Lösunsgmitteln inert. Es gibt keine dokumentierten Inkompatibilitäten für HPLC-Anwendungen.

Agilent Technologies im Internet

Die neuesten Informationen über Produkte und Dienstleistungen von Agilent Technologies erhalten Sie im Internet unter

http://www.agilent.com

Einrichtung einer Methode mithilfe von Ganze Methode bearbeiten

Eine Methode in der ChemStation enthält alle Parameter für die Datenerfassung (Steuerung des Systems) und die Datenanalyse (Verarbeitung der Daten, um quantitative und qualitative Ergebnisse zu erhalten). Auf die Parameter kann über eine Reihe von Bildschirmen zugegriffen werden, die sich jeweils auf ein bestimmtes Modul oder eine bestimmte Funktion konzentrieren. Diese Bildschirme werden durch Klicken auf ein Symbol auf der graphischen Benutzeroberfläche (GUI) oder über die Menüleiste mit ihren Dropdown-Menüs aufgerufen. Eine neue Methode kann erstellt werden, indem entweder eine vorliegende Methode bearbeitet oder indem die leere Methodenvorlage **DEF_LC.M** geladen und bearbeitet wird.

Wenn nur einige wenige Parameter geändert werden sollen, können Sie direkt die entsprechenden Seiten für die Einrichtung der zu ändernden Parameter aufrufen. Für weniger erfahrene Anwender ist es möglicherweise leichter, die Funktion **Edit Entire Method** zu verwenden, bei welcher der Anwender Schritt für Schritt durch die Seiten geführt wird. Der Zugriff auf diese Funktion erfolgt über das Menü **Method > Edit Entire Method**, woraufhin das Dialogfeld **Check Method Sections to Edit** geöffnet wird.

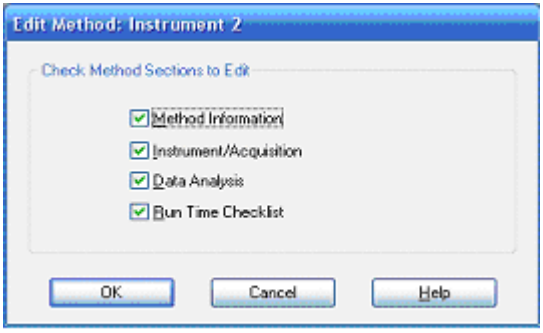


Abbildung 23 Zu bearbeitende Methodenabschnitte prüfen

In diesem Dialogfeld sind die Abschnitte zusammengefasst, die geprüft werden sollen. Es bietet auch die Möglichkeit, einzelne Teile zu überspringen, indem diese abgewählt werden.

Je nach den ausgewählten Teilen werden nacheinander verschiedene Bildschirme angezeigt:

- **Method Information** enthält eine Textbeschreibung der Methode.
- **Instrument/Acquisition** umfasst:
  - Injektorparameter,
  - Pumpenparameter,
  - Ofenparameter,
  - Detektorparameter und
  - Gerätekurven.
- **Data Analysis** umfasst:
  - Signaldetails,
  - Integrationsparameter und
  - Berichtparameter.
- **Run Time Checklist** umfasst die Teile der Methode, die ausgeführt werden.

HINWEIS

Beim Bearbeiten von Methoden unter **Edit Entire Method** wird durch Klicken auf **OK** der aktuelle Eingabebildschirm geschlossen und der nächste Bildschirm aufgerufen. Dies ist ein Einbahn-Verfahren.

Wenn Sie unabsichtlich **OK** anklicken, bevor Sie Ihre Eingaben abgeschlossen haben, klicken Sie auf **Cancel** und starten Sie **Edit Entire Method** von Neuem. Alternativ können Sie auch fortfahren und am Ende zum Bildschirm mit den unvollständigen Eingaben zurückkehren. Nach Klicken auf **Cancel** wird eine Schaltfläche angezeigt, die das **Skip** der restlichen Bildschirme ermöglicht.

Methodeninformationen

Der Bildschirm **Method Information** kann über das Menü **Method > Method Information** oder durch Klicken mit der rechten Maustaste auf die graphische Benutzeroberfläche auch direkt aufgerufen werden.

In dieses Feld können Informationen über die Methode eingegeben werden. Diese Informationen werden oberhalb des Systemdiagramms im Bildschirm **Method and Run Control** eingeblendet, sobald die Methode geladen und im Speicher resident ist.

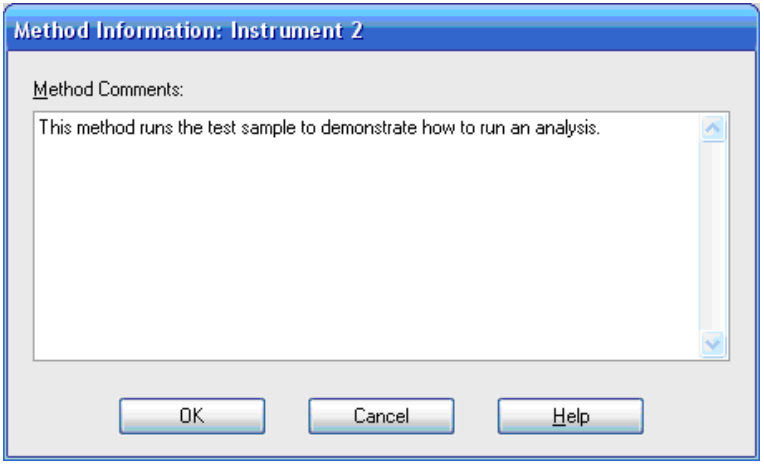


Abbildung 24 Methodeninformationen

Gerät/Aufnahme

Einrichtung einer Gerätemethode

Der Bildschirm **Setup Method** kann über das Menü **Instrument > Setup Instrument Method...** oder durch Klicken mit der rechten Maustaste auf ein beliebiges Modulsymbol auf der graphischen Benutzeroberfläche und Auswahl von **Method...** im Kontextmenü direkt aufgerufen werden. Diese nächste Phase bei **Edit Entire Method** ist der Bildschirm **Setup Method** mit sechs Registerkarten für verschiedene Module oder Funktionen.

Folgende Registerkarten stehen zur Verfügung:

- Automatischer Hochleistungsprobengeber (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- Binäre Pumpe (**BinPump**)
- Säulenthermostat (**TCC**)
- Diodenarray-Detektor (**DAD**)
- **Instrument Curves**

Zum Navigieren zwischen den Registerkarten klicken Sie auf den Namen der Registerkarte oben im Bildschirm. Sind die geänderten Parameter eingegeben, können sie durch Klicken auf **Apply** sofort an das Gerät gesendet werden. Oder: Wenn alle Registerkarten ausgefüllt worden sind, werden die Parameter durch Klicken auf **OK** an die Module gesendet, der Bildschirm wird geschlossen und die Einrichtung der Methode wird der nächsten Phase fortgesetzt.

Die Registerkarten für die Eingabe der Parameter sehen wegen des Konzepts von Agilent, für die Gerätemodule gemeinsame RC-Net-Treiber zu verwenden, in allen Steuerungsprogrammen ähnlich aus (ChemStation, EZChrom, MassHunter usw.).

Zum Ausführen der Beispielanalyse ist es, wie bei den meisten Methoden, nicht erforderlich, alle verfügbaren Parameter zu ändern, der Vollständigkeit halber werden sie jedoch in den nächsten Abschnitten beschrieben.

Registerkarte Automatischer Probengeber

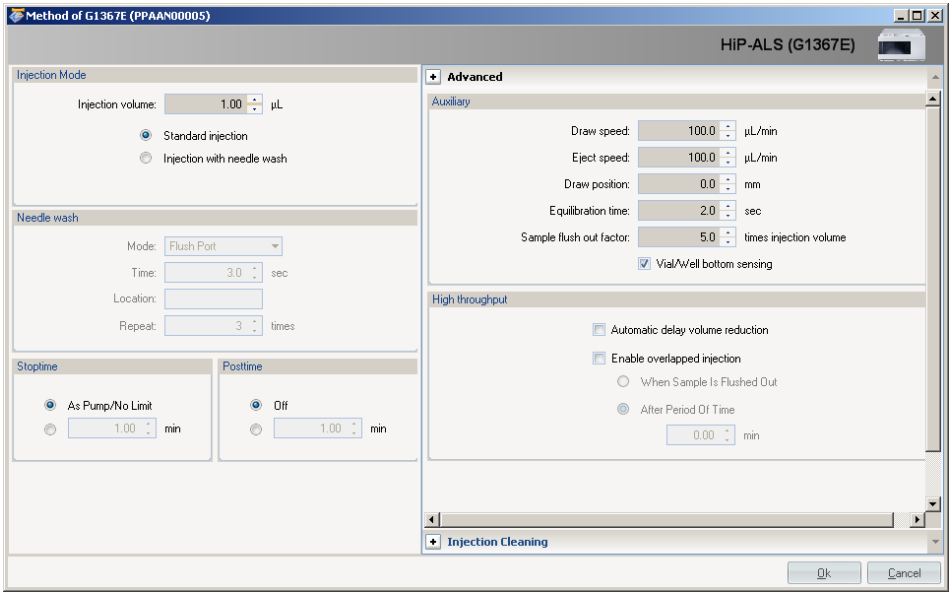


Abbildung 25 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Automatischer Hochleistungsprobengeber

- **Injection Mode**
  - **Injection volume** wird zum Einstellen des zu injizierenden Volumens verwendet (z. B. 1 µl),
  - **Standard injection** zeigt an, dass kein externes Reinigen der Nadel erfolgt,
  - **Injection with needle wash** wird verwendet, um mögliche Verschleppung zu verringern. Dies ist die empfohlene Option, die im nächsten Eintrag konfiguriert wird.
- **Needle Wash**, wenn zuvor ausgewählt
  - **Mode** bestimmt, wie das Äußere der Nadel gespült wird: entweder aktiv am **Flush Port** oder durch Eintauchen in eine angegebene **Wash Vial**.
  - **Time** gibt an (in Sekunden), wie lange von der peristaltischen Pumpe, die an den Spülanschluss angeschlossen ist, Spülflüssigkeit gepumpt wird. Anschließend pumpt sie noch weitere 15 s, um den Spülanschluss zu reinigen.

- **Location** gibt an, welche Flasche oder Mikrotiterplatte verwendet wird, wenn **Wash Vial** ausgewählt wurde.

HINWEIS Flaschen dürfen kein Septum haben, d. h. sie sollten offen sein, um eine Verschleppung von Material auf dem Septum zu Vermeiden.

- **Repeat** bestimmt, wenn Waschflasche ausgewählt wurde, wie oft die Nadel in die Flasche eingetaucht wird (Voreinstellung 3, Maximum 5).

- **Stop Time / Post Time** werden auf **No Limit / Off** gestellt; diese Werte werden auf der Registerkarte Pumpe eingegeben.
- **Advanced - Auxiliary**
  - **Draw speed** ist die Geschwindigkeit, mit der die Probe in die Nadel gesaugt wird. Der Standardwert ist 100 µl/min. Bei viskosen Proben oder um bei kleinen Proben die Präzision zu erhöhen sollte er herabgesetzt werden (< 2 µL).
  - **Eject speed** ist die Geschwindigkeit, mit der die Nadel die Probe abgibt.
  - **Draw position** ist die vertikale Versetzung gegenüber der nominalen Injektionsposition 10 mm über dem Boden einer Flasche. Diese befindet sich etwa auf halber Höhe einer 2 ml-Flasche. Es sollte also eine negative Versetzung eingestellt werden, um die Probe nahe beim Flaschenboden zu entnehmen. Beispielsweise würde bei einem Wert von -7 mm die Nadelspitze 3 mm über dem Flaschenboden platziert.
  - **Equilibration time** ist die Zeitverzögerung zwischen dem Aufziehen der Probe und dem Bewegen der Nadel.
  - **Sample flush out factor** bestimmt, wie lange der Probengeber nach der Injektion wartet, bis das Ventil auf die Nebenflussstellung umgestellt wird. Dadurch wird sichergestellt, dass die Probenzone die Nadel, den Nadelsitz und das Injektionsventil verlassen hat. Der Standardwert ist 5.
  - **Vial/Well bottom sensing** ist eine Alternative zur Versetzung der Aufziehposition. Die Nadel wird langsam nach unten bewegt, bis sie den Boden der Flasche oder der Mikrotiterplatte berührt, und dann wieder 1 mm angehoben. Dies ist eine vielseitig anwendbare Art sicherzustellen, dass die Nadel sich in der Nähe des Flaschenbodens befindet, jedoch dauert die Injektion auf diese Weise etwas länger. Außerdem ist dieses Verfahren nicht geeignet, wenn sich Partikel am Flaschenboden befinden, die die Nadel verstopfen könnten.

- **Advanced - High Throughput**
  - **Automatic delay volume reduction** (ADVR) dient zum Umschalten des Injektionsventils von Injektion auf Nebenfluss, nachdem die Injektion erfolgt ist und ein durch den Probenausspülfaktor festgelegtes Volumen den Injektor durchflossen hat. Dadurch wird das Verzögerungsvolumen des Systems um etwa 70 µl reduziert und die Konzentrationsänderungen im Gradienten erreichen die Säule früher.
  - **Enable overlapped injection** dient ebenfalls zum Umschalten des Injektionsventils von Injektion auf Nebenfluss, nachdem die Injektion erfolgt ist, entweder nachdem die Probe aus dem Injektor gespült wurde oder zu einem festgelegten späteren Zeitpunkt während der Analyse. Anschließend zieht der Injektor zur Vorbereitung auf die nächste Injektion die nächste Probe auf, wodurch die Zykluszeit insgesamt reduziert und der Probendurchsatz gesteigert wird.
- **Injection Valve Cleaning**
  - **Injector Cleaning** ermöglicht das Spülen des Injektionssystems mit Lösungsmittel.
  - **Injection Valve Cleaning** ermöglicht das Umschalten des Ventils zu festgelegten Zeitpunkten während der Analyse, um bei der Injektion problematischer Verbindungen die Verschleppung auf ein Minimum zu begrenzen.

Registerkarte Automatischer Hochleistungsprobengeber (HiP-ALS Injektorprogramm)

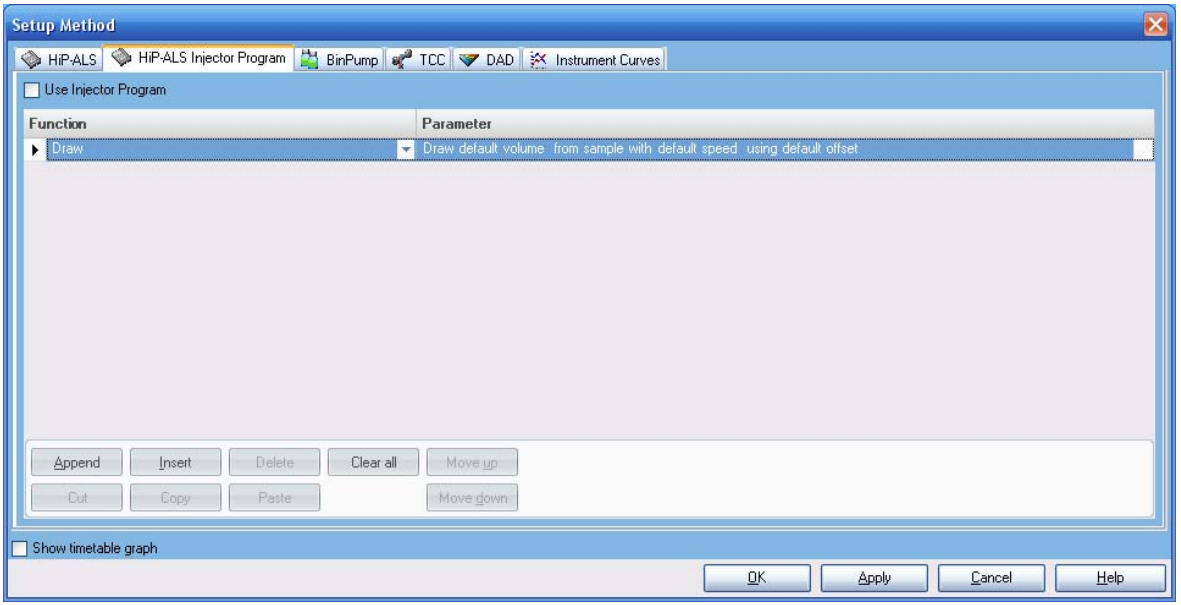


Abbildung 26 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Automatischer HiP-Probengeber Injektorprogramm

Auf dieser Registerkarte können spezielle Injektionsverfahren erstellt werden, die die Verarbeitung von Aliquots aus mehreren Flaschen erlauben, wie beispielsweise bei einer Vorsäulenderivatisierung. Die Reagenzien werden automatisch mit der Probe gemischt, um die Nachweisbarkeit oder Empfindlichkeit zu erhöhen. Ein häufig angeführtes Beispiel ist die Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA- und FMOC-Reagenzien. Weitere Einzelheiten sind im *Handbuch für den Automatischen Hochleistungsprobengeber Agilent 1260 Infinity* beschrieben.

Registerkarte Binäre Pumpe

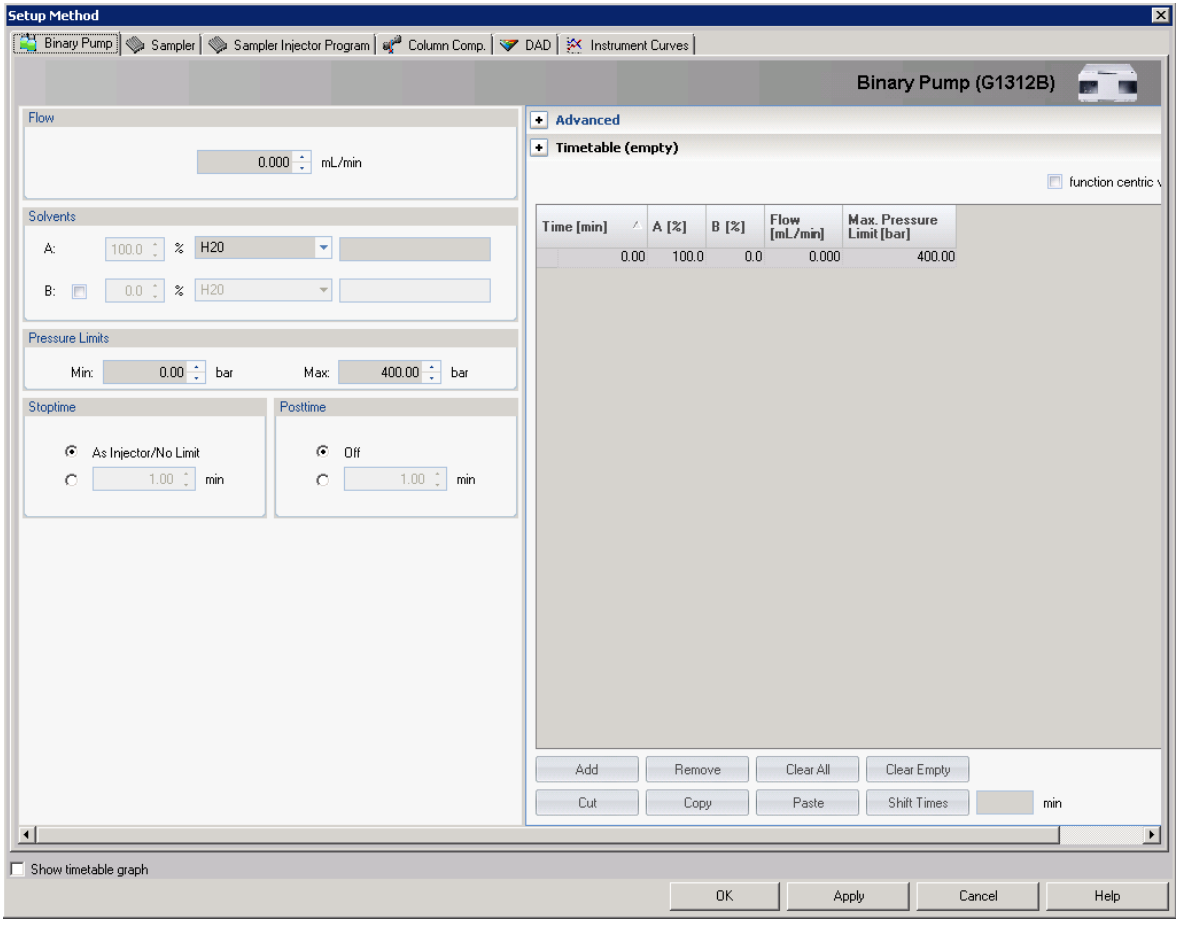


Abbildung 27 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Binäre Pumpe

- **Flow** dient zum Einstellen der Flussrate auf bis zu 5 mL/min. Für die Beispielanalyse werden 4 mL/min verwendet. Wenn der Rückdruck kurzzeitig den eingestellten Maximaldruck erreicht, wird der Fluss einige Sekunden lang verringert, um den Druck zu senken. Wenn der Druck längere Zeit auf diese Weise begrenzt wird, tritt eine Fehlerbedingung auf und der Fluss wird gestoppt.

- **Solvents** gibt an, welche mobilen Phasen zur Verfügung stehen und welche prozentualen Anteile durch die zwei Kanäle A und B gepumpt werden. Mithilfe je eines Dropdown-Feldes für die Kanäle kann ein Lösungsmittel aus einer Liste ausgewählt werden, so dass über die Pumpensteuerung die optimalen Einstellungen für die Kompressibilität verwendet werden. Dadurch werden die Flusseigenschaften optimiert wie in "Optimale Gerätekonfiguration für Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm" auf Seite 43 beschrieben. In ein zweites Textfeld kann eine Beschreibung der mobilen Phase eingegeben werden. Wenn das Lösungsmittelauswahlventil an der Pumpe installiert ist, gibt es für jeden der beiden Kanäle zwei Lösungsmitteloptionen, wobei die richtige Option für die Methode mit der Optionsschaltfläche links von der Beschreibung des Lösungsmittels ausgewählt wird. Die Pumpe stellt binäre Mischungen aus den für Kanal A und B ausgewählten Lösungsmitteln her, z. B. A2 und B1. Es ist nicht möglich, A1 mit A2 oder B1 mit B2 zu mischen. Der eingegebene Wert für den jeweiligen Anteil von A und B bestimmt die Zusammensetzung für eine isokratische Methode oder aber die Anfangsbedingungen bei einer Gradientenmethode sowie die Äquilibrierungsbedingungen zwischen den Analysen. Es wird nur der Wert für B eingegeben; A wird daraufhin automatisch als Wert für 100 % minus B angezeigt, wenn der Cursor bewegt wird. Stellen Sie zur Durchführung der Beispielanalyse für A Wasser und für B 60 % Acetonitril ein. A wird automatisch auf 40 % gesetzt.
- **Timetable** dient zur Eingabe der Änderungen hinsichtlich der prozentualen Zusammensetzung der mobilen Phase aus A und B oder, gegebenenfalls, hinsichtlich der Flussrate und des zulässigen Maximaldrucks, die während der Analyse stattfinden sollen. Im Zeitplan können lineare Änderungen an den Parametern zwischen angegebenen Zeitpunkten festgelegt werden. Die an anderer Stelle erfolgten Einstellungen fungieren auf diesem Bildschirm als Anfangsbedingungen und ändern sich nur dann, wenn im Zeitplan eine Eingabe vorgenommen wird. Wenn z. B. der Fluss während der Analyse konstant bleibt, muss im Zeitplan keine Eingabe bezüglich des Flusses vorgenommen werden. Um eine Eingabe im Zeitplan vorzunehmen, klicken Sie auf die Schaltfläche **Add**, um dem Zeitplan eine Zeile hinzuzufügen. Geben Sie den entsprechenden Zeitpunkt ein, wählen Sie die Art des Eintrags aus der Dropdown-Liste aus (Zusammensetzung, Fluss, Druck) und klicken Sie auf das Feld **Parameter**, um das Eingabefeld für den Wert einzublenden. Wenn im Zeitplan Eingaben außerhalb der logischen Reihenfolge vorgenommen werden, werden die Einträge automatisch in der richtigen zeitlichen Reihenfolge geordnet. Zeilen im Zeitplan können direkt bearbeitet werden. Zum Hinzufügen und Entfernen von Zeilen können die Schaltflächen **Cut**, **Paste** und **Remove** verwendet werden. Es können mehrere Zeilen hinzugefügt

werden, um zur Erstellung von beliebigen Gradientenprofilen eine Serie linearer Gradientensegmente zu definieren. Um einen einfachen Gradienten zu erstellen, löschen Sie zunächst alle Einträge im Zeitplan mittels der Schaltfläche **Clear all**, falls er nicht bereits leer ist. Fügen Sie dann eine Zeile hinzu und geben Sie die erforderliche Zeit und Lösungsmittelzusammensetzung ein. Wenn ein Stufengradient erforderlich ist, kann er mithilfe von zwei Eingaben unter "vor dem Schritt" und "nach dem Schritt", getrennt durch 0,01 min gebildet werden. Ein Stufengradient wird häufig angewendet, um stark retinierte Peaks gegen Ende einer Analyse rasch von der Säule zu eluieren. Dazu wird das stärkere Lösungsmittel und/oder die Flussrate bei einem Stufengradienten erhöht; beispielsweise kann der Prozentsatz von B von 75 % auf 95 % erhöht werden. Es ist nicht nötig, die Einstellungen für den Zeitpunkt 0,00 min in den Zeitplan einzugeben, diese Werte werden von anderen festgelegten Zeitpunkten auf diesem Bildschirm übernommen. Manche Anwender möchten allerdings eine "vollständige" Liste im Zeitplan sehen und nehmen Eingaben für 0,00 min vor. Das ist prinzipiell kein Problem, wenn jedoch die Anfangsbedingungen einmal geändert werden, müssen die neuen Einstellungen sowohl im Zeitplan als auch für die festgelegten Zeitpunkte im Abschnitt **Solvents** des Bildschirms geändert werden.

- **Show timetable graph**: wenn dieses Kästchen angeklickt ist, werden die Änderungen im Zeitplan graphisch dargestellt.
- **Stop Time** gibt den gesamten für die Trennung oder Analyse erforderlichen Zeitraum an und wird von manchen Anwendern auch als "Laufzeit" bezeichnet. Dabei handelt es sich um den Zeitraum in Minuten zwischen dem Zeitpunkt der Injektion und dem Zeitpunkt, an dem die Analyse abgeschlossen ist, an dem also die Datenerfassung beendet wird, der Fluss, die Zusammensetzung und andere Systemeinstellungen auf die Anfangswerte für die Methode zurückgestellt werden und das System für die nächste Injektion verfügbar wird. Er sollte immer mindestens so lang sein wie der letzte Eintrag im Zeitplan, andernfalls endet die Analyse und die Anfangswerte werden wiederhergestellt, bevor die im Zeitplan angegebenen Schritte ausgeführt wurden. **Stop Time** kann auf **No Limit** gesetzt werden. In diesem Fall muss der Anwender die Analyse manuell beenden. Zwar werden **Stop Time**-Parameter für alle Systemmodule eingestellt, die **Stop Time** der Pumpe hat jedoch Vorrang und die Stoppzeit der anderen Module richtet sich im Normalfall nach diesem Wert.
- **Post Time** gibt einen Zeitraum nach dem Ende einer Analyse an, in dem eine neue Injektion unterbunden wird. In diesem Zeitraum kann sich das System nach einer Gradientenanalyse re-äquilibrieren. Im Fall einer isokratischen

Methode kann die Nachlaufzeit auf **Off** gestellt werden. Für eine Gradientenmethode kann der Wert durch Beobachten des Verhaltens der Basislinie experimentell ermittelt werden. Üblicherweise ist jedoch der Zeitraum erforderlich, in dem das Verzögerungsvolumen des Systems sowie mindestens drei bis fünf Säulenvolumina durch das System gespült werden können.

- **Pressure Limits** dient zur Steuerung der Pumpe im Hinblick auf den Druck. Der Maximaldruck der Binären Pumpe 1260 Infinity beträgt 600 bar, manche Säulen sind jedoch für einen niedrigeren Druck ausgelegt. Dieser kann hier eingestellt werden, um die Säule vor Beschädigung zu schützen. Die Pumpe erzeugt eine Fehlerbedingung, wenn dieser Druck überschritten wird. Dadurch wird jede laufende Analyse gestoppt und die Pumpe schaltet in den Bereitschaftsmodus ohne Fluss um. Informationen zum Maximaldruck bei einer bestimmten Säule werden mit der Säule geliefert. Agilent ZORBAX RRHT Säulen sind für den Betrieb bei 600 bar geeignet. Der Grenzwert für niedrigen Druck ist "Aus"-geschaltet, wenn der Wert 0 eingestellt ist, bei jedem anderen Wert wird jedoch ein Pumpenfehler gemeldet, sobald der Druck während des Betriebs unter diesen Wert sinkt. Dies kann als alternative Sicherheitsmaßnahme genutzt werden, wenn sich die Säule nicht in einem Modul mit Lecksensor befindet oder wenn das System trocken läuft. Der untere Druckgrenzwert liegt typischerweise bei 10 bis 20 bar.

Registerkarte Säulenthermostat (TCC)

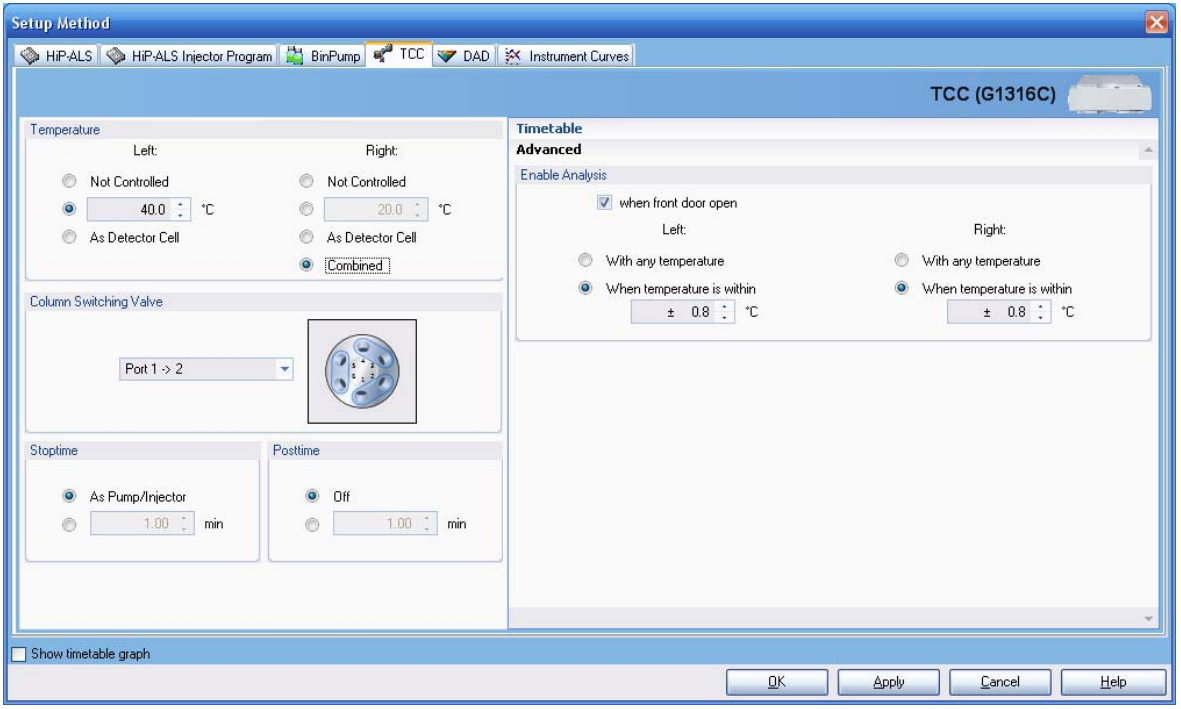


Abbildung 28 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Säulenthermostat

- **Temperature** dient zur Definition der Temperatur des linken und rechten Säulenhalters, die unabhängig voneinander gesteuert oder durch Anklicken der Optionsschaltfläche **Combined** gekoppelt werden können. Bei Kombination der Säulenhalter werden beide Abschnitte durch die Einstellungen für die linke Seite gesteuert. Dies ist nötig, wenn die Säule länger als 15 cm ist und durch beide Abschnitte gehalten werden muss. Die beiden Seiten können unabhängig voneinander genutzt werden, wenn zwei Säulen erforderlich sind, die bei verschiedenen Temperaturen betrieben werden müssen. Solch eine Anordnung kann verwendet werden, wenn außerdem ein Säulenschaltventil installiert wird, mit dem zwischen den beiden Säulen umgeschaltet werden kann. Separate Temperaturzonen sind auch dann nützlich, wenn die Säule auf der einen Seite bei hoher Temperatur betrieben (z. B. über 60 °C) und der Wärmetauscher auf der anderen Seite zum Kühlen des Elutionsmittels verwendet wird, bevor es in den Detektor gelangt. Auf diese Weise wird durch thermische Effekte in der Flusszelle hervorgerufenes Rau-

schen reduziert. Bei Auswahl der Option **As Detector Cell** wird automatisch die Temperatur der Zelle im Detektor bestimmt.

Die Temperatur kann in beiden Zonen jeweils auf Werte zwischen -5 °C und 100 °C eingestellt werden, und der Anwender sollte prüfen, ob eine bestimmte Säule für den Betrieb bei der gewählten Temperatur geeignet ist. (Agilent ZORBAX RRHT StableBond Phasen können am oberen Ende des Temperaturbereichs verwendet werden.) Die Temperatur wird auf ± 0,15 °C genau bis auf 10 °C unter der Umgebungstemperatur reguliert, jedoch ist zu beachten, dass es nur sehr wenige Anwendungen gibt, die bei Temperaturen unter 12-15 °C ausgeführt werden. Der TCC sollte nicht bei Temperaturen verwendet werden, die so niedrig sind, dass Wasser aus feuchter Luft kondensiert, da dies den Lecksensor auslöst.

- **Column Switching Valve**: Diese Option ist nur dann aktiv, wenn zwischen den Säulenhaltern ein Ventil eingebaut ist. Es stehen drei Arten von Ventilen zur Verfügung:
  - 2-Positionen/6-Anschlüsse: zum Umschalten zwischen 2 Säulen
  - 2-Positionen/10-Anschlüsse: zur abwechselnden Regeneration von Säulen
  - 8-Positionen/9-Anschlüsse: zur Auswahl zwischen mehreren Säulen bei MDS

Registerkarte Diodenarray-Detektor (DAD)

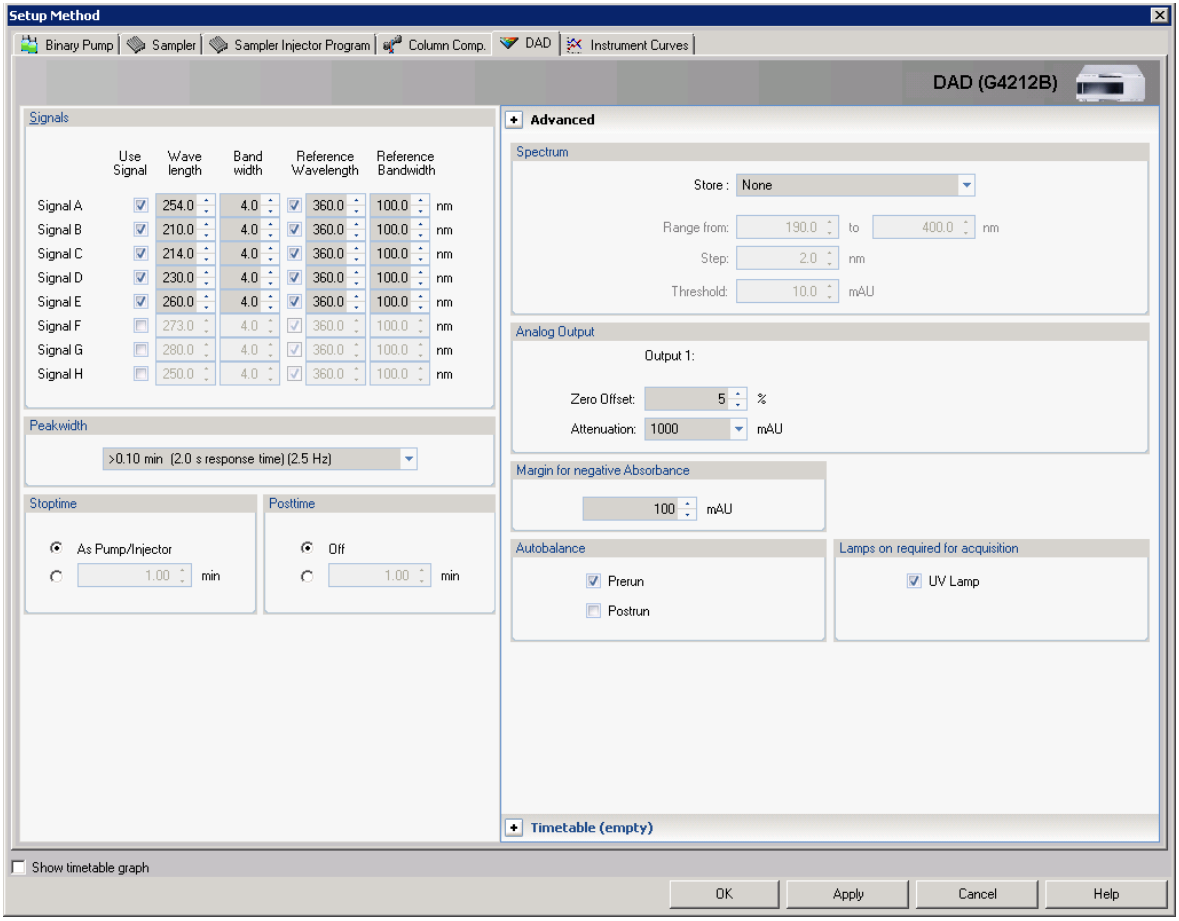


Abbildung 29 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Diodenarray-Detektor

- **Signals**: Es können bis zu acht separate Signale (Chromatogramme) aufgezeichnet werden. Um ein Signal zur Erfassung zu kennzeichnen, aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Use Signal** für dieses Signal und definieren Sie die Wellenlänge und die Bandbreite. Wenn ein Referenzsignal erforderlich ist, müssen Sie hierfür ebenfalls das Kontrollkästchen aktivieren und die entsprechenden Parameter definieren.
  - **Wavelength** dient zum Einstellen der zentralen Wellenlänge (nm) des Signals,

  - **Bandwidth** dient zum Einstellen der Bandbreite (nm) des Signals,
  - **Reference Wavelength** dient zum Einstellen der zentralen Wellenlänge (nm) des Referenzwellenlängebands, der vom Analysesignal subtrahiert wird,
  - **Reference Bandwidth** dient zum Einstellen der Bandbreite (nm) des Referenzsignals.
- **Peakwidth** dient zum Einstellen der Datenerfassungsrate und der Signalfilterung.
- **Stoptime**/**Posttime** werden auf **As Pump/Injector** und **Off** gestellt; diese Werte werden normalerweise auf der Registerkarte **Pump** eingestellt. Falls es erforderlich ist, die Datenanalyse vor dem Ende des in der Pumpe definierten Analysenlaufs zu stoppen, kann jedoch auch eine Detektorstoppzeit eingestellt werden, die sich von der Pumpenstoppzeit unterscheidet. Dies kann der Fall sein, wenn ein Konzentrationsanstieg zur Äquilibrierung am Ende des Gradienten programmiert wurde. So kann der Wert %B beispielsweise zum Zeitpunkt 10 min auf 95 % steigen. Es ist zu erwarten, dass alle Peaks von der Säule eluiert wurden. Der Analysenlauf ist im Wesentlichen beendet, aber es wird ein zusätzliches Gradientensegment hinzugefügt, das %B im Verlauf von zwei Minuten auf den Anfangswert zurückführt, um langsam mit der Äquilibrierung der Säule zu beginnen. Während dieses Zeitraums sind keine brauchbaren Signale zu erwarten, also wird die Detektor-Stoppzeit auf 10 min gesetzt und die Datenerfassung wird beendet, während die Pumpenstoppzeit 12 min beträgt, damit die Verringerung der Konzentration abgeschlossen werden kann. Diese Einstellung kann der Anwender seinen Wünschen entsprechend vornehmen. Manche Anwender nehmen es hin, dass das Chromatogramm in den letzten Minuten keine brauchbaren Daten enthält und zeichnen es trotzdem auf, wodurch sie sich den Umstand einer unterschiedlichen Stoppzeit für den Detektor ersparen. Die Stoppzeit des Detektors hat keinen Vorrang vor der Pumpe und beendet nicht den Lauf, wie das auch bei früheren Stoppzeiten für jedes andere Modul der Fall ist. Daher ist es am bequemsten, Stoppzeiten auf **As Pump/Injector** einzustellen.
- **Timetable** funktioniert auf dieselbe Weise wie bei anderen Modulen: eine Zeile hinzufügen, den zu ändernden Parameter auswählen und die neuen Werte für den Parameter eingeben. Die Änderungen für den Detektor treten sofort zum angegebenen Zeitpunkt in Kraft. Die folgenden Parameter können während der Analyse geändert werden:
  - **Balance**
  - **Change Signal**

- **Change Threshold**
- **Change Peak –detector Peakwidth**
- **Change Spectra Acquisition Mode**
- **Change Contacts**

- **Advanced - Spectrum**

  Spektren können während der Analyse auf kontinuierliche oder peakgesteuerte Weise gespeichert werden (dies gilt für die ChemStation-Software). Einige Software-Pakete, z. B. EZChrom, erlauben ausschließlich die kontinuierliche Aufnahme aller Spektren und die peakgesteuerte Option ist nicht vorgesehen). Bei der Erfassung von Spektren und Signalen handelt es sich um unabhängige Vorgänge, die von der Firmware des Detektors ausgeführt werden. Es müssen hierfür durch die Computer-Software keine Daten aus der 3D-Matrix extrahiert werden. Die Geschwindigkeit, mit der Spektren aufgenommen werden, wird durch die Einstellung der **Peakwidth** bestimmt. In dem unter **Peakwidth** angegebenen Zeitraum werden acht Spektren aufgenommen. Die Peakdetektion bei Signal A wird von der Firmware nur ausgeführt, um zu bestimmen, welche peakgesteuerten Spektren gespeichert werden sollen. Bei mehreren Signalen kann es erforderlich sein, Signal A zur Breitbanddetektion zu verwenden, um sicherzustellen, dass für alle Signale unterschiedlicher Wellenlänge Peakspektren verfügbar sind.

  - **Store** dient zur Steuerung des Spektrenaufnahmemodus und bietet die folgenden Optionen:

    None: Es werden keine Spektren gespeichert;

    Apex+Baselines: Aufnahme von drei Spektren, d. h. am Beginn, am Maximum und am Ende des Peaks;

    Apex+Slopes+Baselines: Aufnahme von fünf Spektren, d. h. am Beginn, an der Aufwärtsflanke, am Maximum, an der Abwärtsflanke und am Ende des Peaks;

    All in Peak: Speichern aller in einem Peak verfügbaren Spektren;

    All: Speichern aller Spektren während des gesamten Verlaufs der Analyse;

    Every 2nd Spectrum: Speichern jedes zweiten Spektrums während des gesamten Verlaufs der Analyse.

  - **Range**: Spektren können über den gesamten Bereich des Detektors hinweg gespeichert werden, von 190 nm bis 640 nm, oder in jedem beliebigen, vom Anwender angegebenen begrenzten Bereich. (Dadurch verringert sich auch die zu speichernde Datenmenge).

- **Step**: dient zur Festlegung des Intervalls (nm) der für ein Spektrum gespeicherten Daten und beeinflusst daher die spektrale Auflösung. Die Standardeinstellung 2 nm ist für die meisten Anwendungen gut geeignet.
- **Threshold**: Von Peaks mit einer Höhe unterhalb dieses vom Anwender bestimmten Wertes (mAU) werden keine Spektren gespeichert.

- **Advanced - Analog Output**

  Der Diodenarray-Detektor 1260 Infinity verfügt über eine Analogausgangsbuchse für die Signalübermittlung an Datensysteme, die keinen digitalen Input unterstützen. Folgendes kann eingestellt werden:

  - **Zero Offset** dient zur Einstellung des Nullpunkts auf einen festgelegten Prozentsatz des Ausgangssignals, um so etwas Spielraum für negative Drift zu erlauben.
  - **Attenuation** setzt die eingestellte Extinktion mit dem vollen Ausgangssignal gleich.

- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**

  Die Standardeinstellung ist 100 mAU, was bedeutet, dass der Detektor, unter Berücksichtigung der Einstellung für den Nullpunkt, über einen ausreichenden dynamischen Bereich verfügt, der eine Messung bis hinunter zu diesem Wert ermöglicht. Zur Messung größerer negativer Peaks oder zum Verfolgen einer Basislinie mit einer starken negativen Drift muss der Wert nach unten korrigiert werden, um ein "Aufsetzen" des Signals an der unteren Grenze des Bereichs zu verhindern. Diese Korrektur sollte jedoch nicht ohne guten Grund vorgenommen werden, denn eine stärker negative Einstellung bewirkt eine Erhöhung des Basislinienrauschens und schränkt den Bereich ein, der für die Erfassung positiver Peaks zur Verfügung steht.

- **Advanced - Autobalance** dient dazu, die Extinktion bei allen Wellenlängen auf Null zu setzen (also alle Punkte des Spektrums mit Null abzugleichen), bewirkt also auch einen Nullpunktabgleich der Basislinie. **Prerun** wird ausgewählt, um einen Abgleich unmittelbar vor Beginn der Analyse vorzunehmen; dies ist die normale Vorgehensweise. Manchmal wird alternativ die Option **Postrun** gewählt, so dass der Abgleich am Ende der Analyse nach Ablauf der Nachlaufzeit erfolgt. Wenn zum Beispiel das Signal immer eine negative Drift zeigt und der Anwender es vorzieht, dass die Analyse bei einem Extinktionswert von null endet, kann so der korrekte Nullwert für die nächste Analyse eingestellt werden. Die vorhergegangene Analyse, an deren Ende der Abgleich vorgenommen wurde, wird dadurch jedoch nicht verändert.

- **Advanced - Lamps on required for acquisition**: Der Diodenarray-Detektor 1260 Infinity verfügt über eine UV-Lampe, die für die Analyse eingeschaltet sein muss; daher sollte dieses Kontrollkästchen aktiviert sein.

Registerkarte Instrument Curves

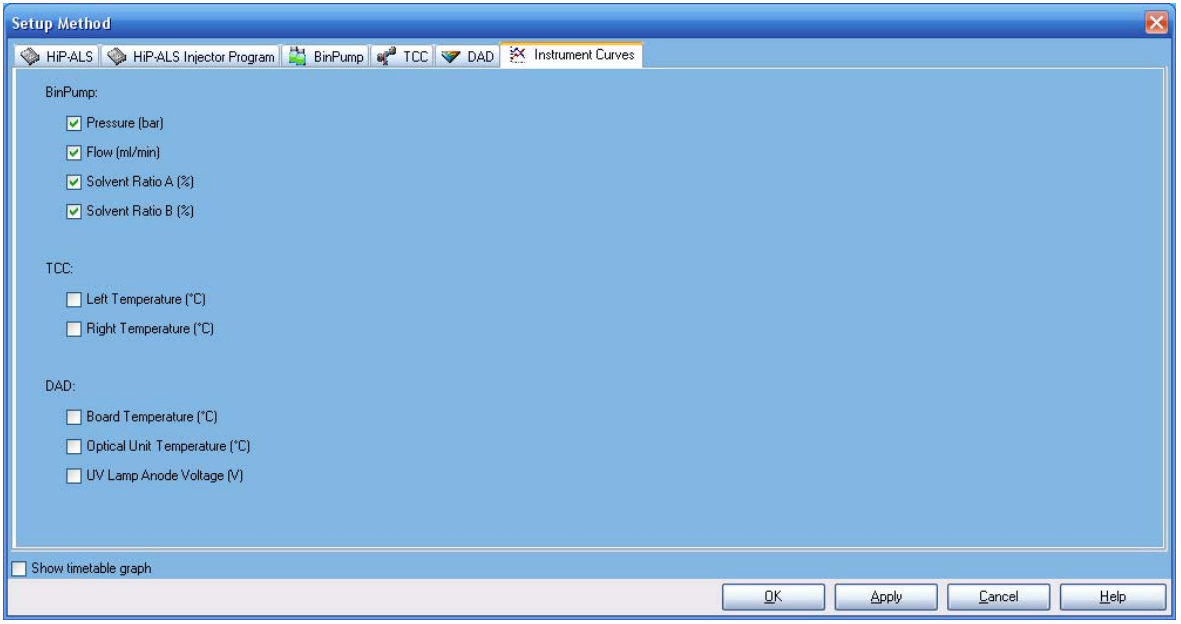


Abbildung 30 Bildschirm Methode einrichten - Registerkarte Gerätekurven

Durch Anklicken des entsprechenden Kontrollkästchens auf der Registerkarte Gerätekurven wird die Speicherung von weiteren erfassten Datenströmen über die Detektordaten hinaus zusammen mit den Daten ermöglicht. Diese werden hauptsächlich zu diagnostischen Zwecken verwendet. Dabei handelt es sich um:

- Pumpe:
  - Druck
  - Fluss
  - A/B-Zusammensetzung: nützlich für eine Überlagerung des Chromatogramms mit dem Gradientenprofil
- Säulenthermostat:
  - Temperatur links/rechts

- Detektor:
  - Temperatur der Platine
  - Temperatur der Optikeinheit
  - Anodenspannung der UV-Lampe

Datenanalyse

Signaldetails

Auf den Bildschirm **Signal Details** kann in der Ansicht **Method and Run Control** auch direkt zugegriffen werden: Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Symbol **Calibration** auf der graphischen Benutzeroberfläche und wählen Sie dann **Signal Details** im Kontextmenü. In der Ansicht Datenanalyse kann über das Menü **Calibration > Signal Details** auf den Bildschirm zugegriffen werden.

Der Bildschirm **Signal Details** ist die nächste Phase bei **Edit Entire Method**. Hier wird eingegeben, welche der erfassten Signale bei der Datenanalyse zu verarbeiten sind. Im Dropdown-Feld sind die verfügbaren Signale aufgelistet, darunter die Analysesignale, die in den Detektoreinstellungen festgelegt wurden, und aufgezeichnete Parameter wie Temperatur, Fluss, Zusammensetzung Druck und Diagnosetraces. Wählen Sie ein Signal aus und klicken Sie auf **Add to Method**, um es in die Tabelle **Signal Details** im unteren Bereich des Bildschirms zu überführen. Sie können einzelne oder alle erfassten Detektorsignale zur Verarbeitung auswählen. Wenn keine Signale ausgewählt wurden, ist die Tabelle leer. In diesem Fall verarbeitet ChemStation standardmäßig alle erfassten Detektorsignale.

Es kann vorkommen, dass ein Anwender eine vorhandene Methode bearbeitet, um eine neue zu erstellen, und beim Versuch, die Methode auszuführen, tritt eine **Parameter Mismatch** auf. Der Grund dafür ist, dass die **Signal Details** der ursprünglichen Methode ein spezielles Signal enthielten, beispielsweise 250 nm mit 8 nm Bandbreite, und dies in der neu erstellten Methode beispielsweise in 254 nm/12 nm geändert wurde. Die Tabelle **Signal Details** enthält immer noch die ursprünglichen Angaben, was bedeutet, dass ein Signal verarbeitet werden soll, das gar nicht mehr erfasst wird. Zur Korrektur des Problems markieren Sie das ursprüngliche Signal in der Tabelle und entfernen Sie es durch Anklicken der Schaltfläche **Delete Row**.

Bei einem System mit mehreren Detektoren, beispielsweise einem Diodenarray-Detektor und einem Massenspektrometer, erlauben die Zeilen **Signal Description** die Eingabe von Verzögerungszeiten für den stromabwärts gelegenen Detektor, so dass die Software die von den verschiedenen Detektoren erfassten Peaks zur Deckung bringen kann.

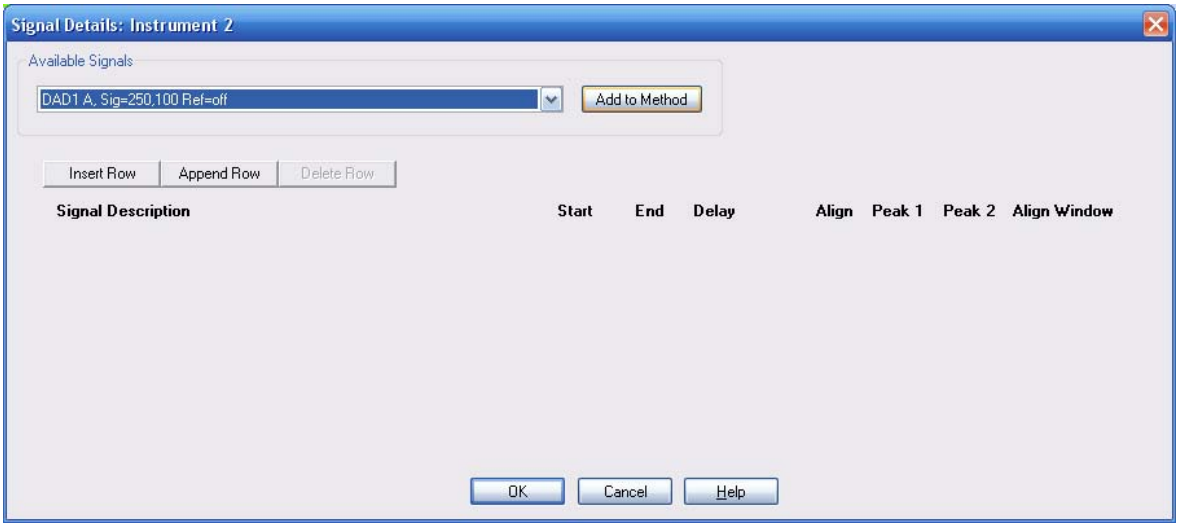


Abbildung 31 Signaldetails

Integrationsereignisse bearbeiten

Der Bildschirm **Edit Integration Events** kann in der Ansicht **Method and Run Control** durch Rechtsklicken auf das Symbol Integrationsereignisse auf der graphischen Benutzeroberfläche und anschließendes Klicken auf **Edit Integration Events** im Kontextmenü auch direkt aufgerufen werden. In der Ansicht **Data Analysis** kann er über das Menü **Integration > Integration Events...** oder das Aufgabensymbol **Edit Integration Events** aufgerufen werden.

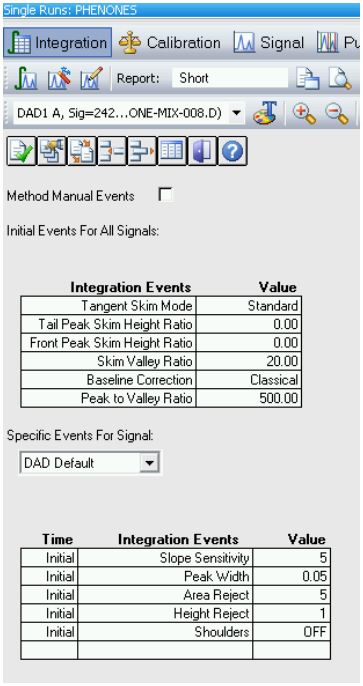


Abbildung 32 Bildschirm Bearbeiten von Integrationsereignissen

Integration, Kalibrierung und Berichte bilden den Datenanalyse-Teil der Methode. Die Integrationsparameter und die Kalibrierungstabelle sind einfacher einzurichten, sobald Daten erfasst worden sind und die Daten in der Ansicht Datenanalyse überprüft werden. Die Integrationsereignisse können zu diesem Zeitpunkt optimiert werden und für die anfänglichen Läufe zur Datenerfassung werden oft die Standardeinstellungen verwendet.

Der Bildschirm **Edit Integration Events** umfasst zwei Tabellen:

- **Initial Events For All Signals** enthält Ereignisse (Integrationsparameter), die auf alle mit der Methode erfassten Signale zutreffen,
- **Specific Events For Signal** enthält Ereignisse, die für einen Typ Detektor oder für verschiedene Signale desselben Detektors spezifisch sind.

  Schlüsselparameter in dieser Tabelle sind:

  - **Slope Sensitivity** gibt die Steigung und die Krümmung der Basislinie an, die erforderlich ist, um Anfang und Ende eines Peaks zu kennzeichnen.
  - **Peak Width** Hier wird die Breite eingegeben, die der schmalste Peak in halber Höhe aufweist. So kann vom Integrator besser zwischen Rauschen und sehr kleinen Peaks unterschieden werden.
  - **Area Reject / Height Reject** dient zur Eingabe von Werten für die Fläche oder Höhe von Peaks, unterhalb derer die Ergebnisse der entsprechenden Peaks zurückgewiesen werden.
  - **Integration OFF/ON** ermöglicht das Unterdrücken der Integration zwischen den angegebenen Grenzen. Wird fast immer verwendet, um die Integration im Bereich zwischen der Injektion und der Lösungsmittelfront oder dem Marker für einen nicht retinierten Peak zu verhindern.

Zeilen wie **Integration OFF/ON** werden der Tabelle mithilfe der Symbole oben im Fenster hinzugefügt.

Klicken Sie zum Beenden auf **OK** und der nächste Bildschirm für das Verfahren Ganze Methode bearbeiten wird geöffnet.

Bericht spezifizieren

Der Bildschirm **Specify Report** kann in der Ansicht **Method and Run Control** durch Rechtsklicken auf das Symbol Bericht auf der graphischen Benutzeroberfläche und anschließendes Klicken auf **Specify Report** im Kontextmenü auch direkt aufgerufen werden. In der Ansicht **Data Analysis** kann er über das Menü **Report > Specify Report** oder das Aufgabensymbol Bericht spezifizieren aufgerufen werden.

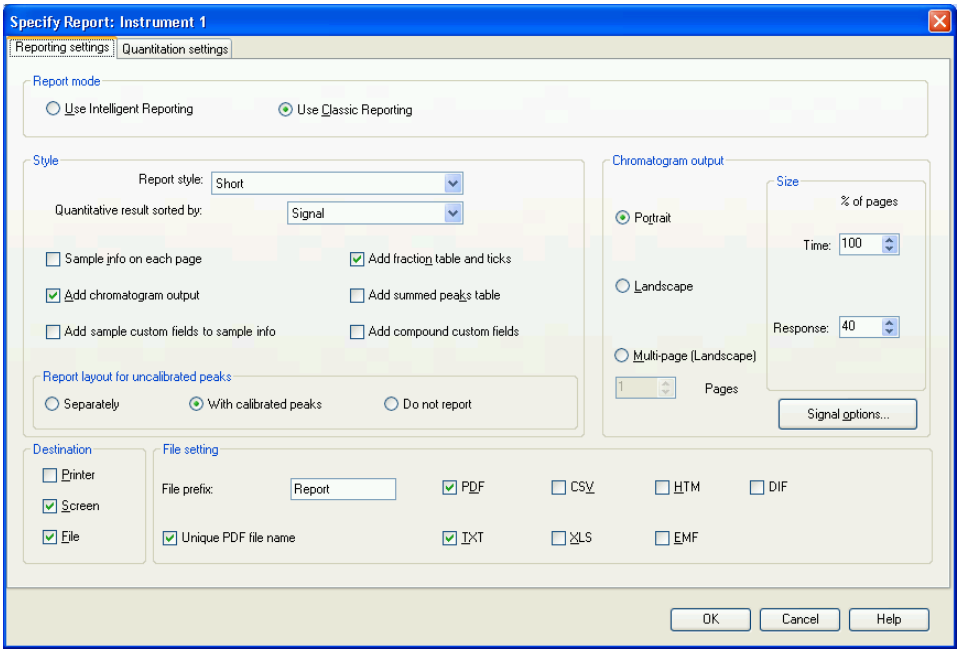


Abbildung 33 Bildschirm Bericht spezifizieren

Um einen einfachen Bericht über Fläche% mit der klassischen Berichtfunktion einzurichten, der an den Drucker übertragen und als pdf-Datei ausgedruckt wird, geben Sie die folgenden Einstellungen in die entsprechenden Abschnitte im Bildschirm Bericht spezifizieren ein:

Auf der Registerkarte **Reporting settings**:

- **Report mode**: Verwenden Sie Klassischen Bericht erstellen
- **Style**
  - **Report Style**: Kurz

  - **Quantitative results sorted by**: Signal
  - **Add Chromatogram Output**: Aktiviert
- **Chromatogram Output**: Hochformat
- **Size**:
  - **Time**achse 100 % der Seite
  - **Response**achse 40 % der Seite
- **Destination**
  - **Printer**: Aktiviert
  - **Screen**: Nicht aktiviert
  - **File**: Aktiviert
- **File Setting**:
  - **PDF**: Aktiviert
  - **Unique PDF file name**: Aktiviert

Auf der Registerkarte **Quantitation settings**:

- **Calculation mode**
  - **Calculate**: Prozent
  - **Based on**: Fläche

Klicken Sie zum Beenden auf **OK** und der nächste Bildschirm für das Verfahren Ganze Methode bearbeiten wird geöffnet.

Gerätekurven

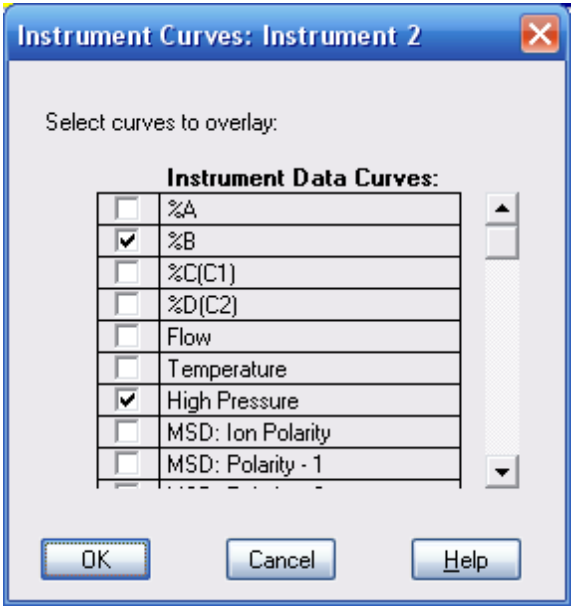


Abbildung 34 Bildschirm Gerätekurven

Sind die Kontrollkästchen **Instrument Curves** aktiviert, werden die entsprechenden aufgezeichneten Parameter dem Chromatogramm als Graph überlagert.

Laufzeit-Checkliste

Die **Run Time Checklist** kann über das Menü **Method > Run Time Checklist...** oder durch Klicken auf das Symbol **Run Time Checklist** rechts oben im Bildschirm auch direkt aufgerufen werden.

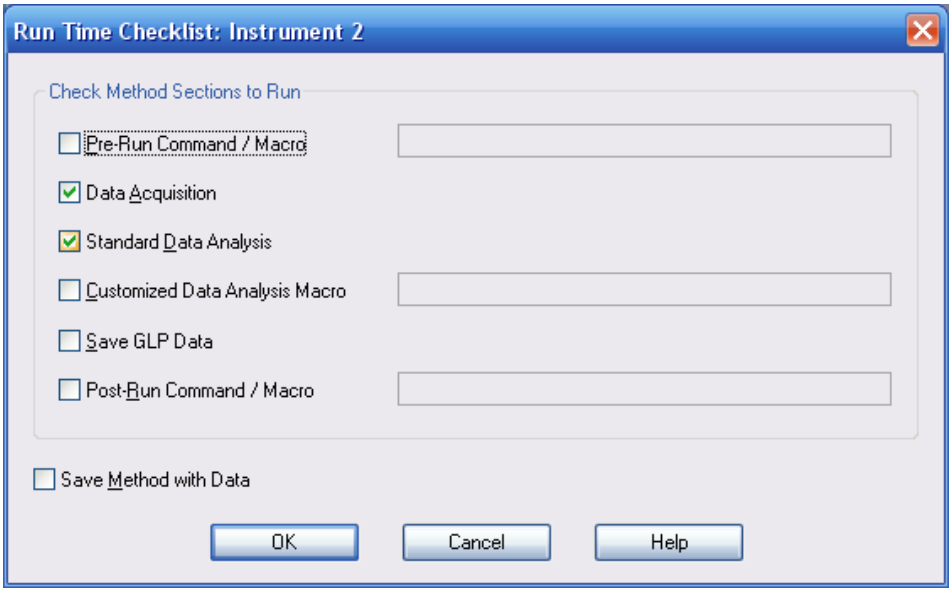


Abbildung 35 Bildschirm Laufzeit-Checkliste

In der **Run Time Checklist** wird festgelegt, ob die Methode sowohl Datenerfassung als auch Datenanalyse umfassen soll. Außerdem bietet sie die Möglichkeit, an verschiedenen Zugriffspunkten Makrobefehle oder -programme mit dem Arbeitsablauf zu verlinken. In den meisten Fällen werden die Kontrollkästchen **Data Acquisition** und **Standard Data Analysis** aktiviert. Wenn keine Datenanalyse erforderlich ist, beispielsweise bei einer Reihe von Läufen zur Methodenentwicklung, kann **Standard Data Analysis** deaktiviert werden, so dass kein Bericht erstellt wird. Die Daten können dann später in der Ansicht **Data Analysis** visuell überprüft werden.

Um ein Makroprogramm an einem der Zugriffspunkte mit der Methode zu verlinken, wird das entsprechende Kontrollkästchen aktiviert und der Name des Makros wird in das Textfeld rechts eingegeben. Die Software sucht im Verzeichnis C:\Chem32\Core nach dem Makro; wenn es an einem anderen Ort gespeichert ist, muss der Pfad ebenfalls eingegeben werden.

Dies sind die Zugriffspunkte im Arbeitsablauf der Methode:

- **Pre-Run Command / Macro**
- **Customized Data Analysis Macro**
- **Post-Run Command / Macro**

Save Method with Data dient zum Speichern einer Kopie der Methode in der Datendatei, die den Namen RUN.M erhält. Dies ist nicht erforderlich, wenn die ChemStation in der üblichen Konfiguration betrieben wird, da die Methode von der Software grundsätzlich in der Datendatei gespeichert wird (alle Versionen ab B.02.01). Nur wenn die ChemStation so konfiguriert wurde, dass **Unique Sequence Folder Creation** ausgeschaltet ist und somit die Methode nicht routinemäßig in der Datendatei gespeichert wird, ist diese Option relevant.

Da dies der letzte Bildschirm im Verfahren ist, werden durch Klicken auf **OK** die **Run Time Checklist** und das Verfahren **Edit Entire Method** beendet. Die Methode sollte nun im Methoden-Masterverzeichnis gespeichert werden, standardmäßig C:\Chem32\1\Methods, und zwar über **File > Save As > Method** oder **Method Menu > Save Method As**.

Software-Vokabular

1

1260 Infinity Autosampler
Automatischen Probengeber 1260 Infinity

1260 Infinity Binary Pump
Binäre Pumpe 1260 Infinity

1260 Infinity DAD
Diodenarray-Detektor 1260 Infinity

1290 Infinity TCC
1290 Infinity Säulenthermostaten

A

Add
Hinzufügen

Add Chromatogram Output
Chromatogrammausgabe hinzufügen

Add to Method
Zur Methode hinzufügen

Adjust
Anpassen

Advanced
Erweiterte Einstellungen

Advanced - Analog Output
Erweiterte Einstellungen - Analogausgang

Advanced - Autobalance
Erweiterte Einstellungen - Automatischer Abgleich

Advanced - Auxiliary
Erweiterte Einstellungen - zusätzliche Einstellungen

Advanced - High Throughput
Erweiterte Einstellungen - Hoher Durchsatz

Advanced - Lamps on required for acquisition
Erweiterte Einstellungen - Lampen müssen für Erfassung eingeschaltet sein

Advanced - Margin for Negative Absorbance
Erweiterte Einstellungen - Toleranz für negative Extinktion

Advanced - Spectrum
Erweiterte Einstellungen - Spektrum

All
Alle

All in Peak
Alle im Peak

All Programs
Alle Programme

Apex+Baselines
Maximum + Basislinien

Apex+Slopes+Baselines
Maximum + Flanken + Basislinien

Apply
Übernehmen

Apply to Method
Auf Methode anwenden

Area Reject
Fläche zurückweisen

Area Reject / Height Reject
Fläche zurückweisen/minimale Höhe

As Detector Cell
Wie Detektorzelle

As Pump/Injector
Wie Pumpe/Injektor

Attenuation
Dämpfung

Automatic delay volume reduction
Automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens

Available Signals
Verfügbare Signale

B

Balance
Abgleich

Bandwidth
Bandbreite

Based on
Grundlage

Baseline Correction
Basislinienkorrektur

C

Calculate
Berechnen

Calculation mode
Berechnungsmodus

Calibration
Kalibrierung

Cancel
Abbrechen

Change Contacts
Ändern der Kontakte

Change Peak –detector Peakwidth
Änderung des Peaks bzw. der Detektorpeakbreite

Change Signal
Änderung des Signals

Change Spectra Acquisition Mode
Änderung des Spektrenaufnahmemodus

Change Threshold
Änderung des Schwellenwerts
Change...
Ändern ...
Check Method Sections to Edit
Zu bearbeitende Methodenabschnitte prüfen
Chromatogram Output
Chromatogrammausgabe
Clear all
Alle löschen
Column Switching Valve
Säulenschaltventil
Combined
Kombiniert
Comment
Anmerkungen
Customized Data Analysis Macro
Anwenderdefinierte Datenanalyse Makro
Cut
Ausschneiden

D

Data Acquisition
Datenerfassung
Data Analysis
Datenanalyse
Delete Row
Zeile löschen
Destination
Ausgabe
Draw position
Aufziehposition
Draw speed
Aufziehgeschwindigkeit

E

Edit Entire Method
Ganze Methode bearbeiten
Edit Integration Events
Integrationsereignisse bearbeiten
Edit Signal Plot
Signal-Plot bearbeiten
Eject speed
Ausstoßgeschwindigkeit
Enable overlapped injection
Überlappenden Injektionsmodus aktivieren
Enhanced Solvent Compressibility
Verbesserte Lösungsmittelkompressibilität
Equilibration time
Äquilibrierungszeit
Every 2nd Spectrum
Jedes 2. Spektrum

F

File
Datei
File Setting
Dateieinstellung
Flow
Fluss
Flush Port
Spülanschluss

H

Height Reject
minimale Höhe
HiP-ALS Injector Program
HiP-ALS Injektorprogramm

I

Initial Events For All Signals
Anfängliche Ereignisse für alle Signale
Injection Mode
Injektionsmodus
Injection Valve Cleaning
Injektionsventil reinigen
Injection volume
Injektionsvolumen
Injection with needle wash
Injektion mit Nadelreinigung
Injector Cleaning
Injektor reinigen
Instrument
Gerät
Instrument Curves
Gerätekurven
Instrument/Acquisition
Gerät/Aufnahme
Instruments
Geräte
Integrate
Integrieren
Integration Events
Tabelle Integrationsereignisse
Integration Events...
Integrationsereignisse ...
Integration OFF/ON
Integration EIN/AUS
Intensity Test
Intensitätstest

L

Launch online
Online starten
Load Method
Methode laden
Location
Position

M

Method
Methode
Method and Run Control
Methoden- und Analysenkontrolle
Method History
Methodenhistorie
Method Information
Methodeninformationen
Method Menu
Methodenmenü
Method...
Methode ...
Methods
Methoden
Mode
Modus

N

Name Pattern
Name Muster
Needle Wash
Nadelreinigung
New Method...
Neue Methode ...
No Limit
Unbegrenzt
No Limit / Off
Unbegrenzt/Aus
None
Keine

O

Off
Aus
Online Plot
Online-Plot
Online Signals
Online-Signale
OpenLAB Control Panel
OpenLAB Teilfenster

P

Parameter Mismatch
Parameter-Nichtübereinstimmung
Paste
Einfügen
Peak Width
Peakbreite
Peakwidth
Peakbreite
Post Time
Nachlaufzeit
Postrun
Nachlaufphase
Post-Run Command / Macro
Nachanalyse Befehl/Makro
Posttime
Nachlaufzeit
Prerun
Vorlaufphase
Pre-Run Command / Macro
Vorlaufphase Befehl/Makro
Pressure Limits
Druckgrenzwerte
Printer
Drucker
Pump
Pumpe

Q

Quantitation settings
Quantifizierungseinstellungen
Quantitative results sorted by
Quantitative Ergebnisse sortiert nach

R

Range
Bereich
Reference Bandwidth
Referenzbandbreite
Reference Wavelength
Referenzwellenlänge
Remove
Entfernen
Repeat
Wiederholen
Report
Bericht
Report mode
Berichtmodus
Report Style
Berichtstil
Reporting settings
Berichteinstellungen
Response
Extinktions
Run Control
Analysensteuerung
Run Method
Methode ausführen
Run Queue
Analysenwarteschlange
Run Sequence
Sequenz ausführen
Run Time Checklist
Laufzeit-Checkliste
Run Time Checklist...
Laufzeit-Checkliste ...

S

Sample flush out factor
Probenausspülfaktor
Sample Info
Probeninformation

Sample name
Probenname
Save
Speichern
Save As...
Speichern unter ...
Save Method As...
Methode speichern unter ...
Save Method with Data
Methode mit Daten speichern
Screen
Bildschirm
Select Run Method Task
Aufgabe Analysenmethodenauswahl
Selected Signal
Ausgewählte Signale
Selected Signals
Ausgewählte Signale
Set Integration Events Table
Tabelle Integrationsereignisse einrichten
Setup Instrument Method...
Gerätemethode einrichten ...
Setup Method
Methode einrichten
Show timetable graph
Graph für Zeitplan anzeigen
Signal Description
Signalbeschreibung
Signal Details
Signaldetails
Signal Window 1
Signalfenster 1
Signals
Signale
Single Runs
Einzelne Analysen
Size
Größe
Skip
Überspringen
Slope Sensitivity
Steigungsempfindlichkeit
Solvents
Lösungsmittel
Specific Events For Signal
Spezielle Ereignisse für einzelne Signale
Specify Report
Bericht spezifizieren
Spectrum Store
Speichern von Spektren
Standard Data Analysis
Standarddatenanalyse
Standard injection
Standardinjektion
Step
Schritt
Stop Time
Stoppzeit
Stop Time / Post Time
Stoppzeit/Nachlaufzeit
Stoptime
Stoppzeit
Store
Speichern
Style
Stil
Subdirectory
Unterverzeichnis
Switch [module name] on
[Modulname] einschalten
System On/Off
System Ein/Aus

T

Temperature
Temperatur
Threshold
Schwellenwert
Time
Zeit
Timetable
Zeitplan

U

Unique PDF file name
Eindeutiger PDF-Dateiname
Unique Sequence Folder Creation
Erstellen eines eindeutigen Sequenzordners
Use Signal
Signal verwenden

V

Vial/Location
Probenflasche/Ort
Vial/Well bottom sensing
Flaschen-/Plattenboden detektieren
View
Ansicht

W

Wash Vial
Waschflasche
Water
Wasser
Wavelength
Wellenlänge
Wavelength Calibration
Wellenlängenkalibrierung

Z

Zero Offset
Nullpunktverschiebung

Index

A

Abmessungen 23
ADVR 51
Agilent
  im Internet 114
aktive Kolbenhinterspülung 11
Alternierende Säulenregeneration 50
Analogsignalausgang 25
Analyse
  Daten 100
Auflösung
  erhöhen 55
Ausgleich, Kompressibilität 24
automatische Reduktion des Verzögerungsvolumens 51

B

Bereich der Zusammensetzung 25
Bericht
  Spezifikation 103
Betriebshöhe 23
Betriebstemperatur 23
Binäre Pumpe 11

D

Datenanalyse 116
Datenauswertung und Steuerung 25
Daten
  Analyse 100
DEF_LC.M 115
Design 11
Detektor
  Erzielen höherer Empfindlichkeit 65
Diodenarray-Detektor
  Beschreibung 19
Druck
  Betriebsbereich 24
  Schwankung 24
Drucksensor 14

E

Einführung zum Entgaser 14
Einrichtung einer Gerätemethode 118
einstellbarer Flussbereich 24
Empfindlichkeit
  Gerätekonfiguration 64
  Optimierung 63
Empfohlener pH-Bereich 24
Extrasäulenvolumen
  Beschreibung 41

F

Flussbereich
  einstellbar 24
  operativ 24
Flussgenauigkeit 24
Flussrichtigkeit 24
Flusszelle 66
Frequenzbereich 23
Funktionsweise 14

G

Genauigkeit der Zusammensetzung 25
Gerät/Aufnahme 116
Gewicht 23
Gradientenerzeugung 24

H

Hochdruckmischung 11
Hydrauliksystem 24

I

Injektionsvolumen
  höhere Volumina erzielen 47
Installation
  Datensystem 72
  Lab Advisor 73
  Software-Steuerung 72
Integration 102
Internet 114

K

Kompressibilitätsausgleich 24
Konfiguration für geringes Verzögerungsvolumen 43
Konfiguration für mittleres Verzögerungsvolumen 44
Konfiguration für Standard-Verzögerungsvolumen 45
Konfiguration
  geringes Verzögerungsvolumen 43
  mittleres Verzögerungsvolumen 44
  Standard-Verzögerungsvolumen 45

L

Laden
  Standard 88
Laufzeit-Checkliste 116
Leistung
  Optimierung 55
  Spezifikationen 24

Lösungsmittel, Wechsel 83
Lösungsmittelauswahlventil 11
Lösungsmittelwechsel 83
Luftfeuchtigkeit 23

M

Max. Höhe bei Nichtbetrieb 23
Methode
  Einrichtung 96
  einzelne Injektion 98
  Ganze Methode bearbeiten 115
  Standard 115
Methodeninformationen 116, 117
Mischer 11

N

Netzfrequenz 23
Netzspannung 23
Netzwerkintegration 74

O

Online-Plot
  Konfigurieren 89, 89
optimierte Konfiguration
  Säulen mit ID 2,1 mm 43
  Säulen mit ID 3 und 4 mm 45
Optimierung der Auflösung
  chromatographische Bedingungen 61
  Datenrate 60
  Extrasäulenvolumen 59
  Säulenthermostat 58
Optimierung
  Bedingungen bei der HPLC 31
  chromatographische Trennung 31
  Detektorempfindlichkeit 65
  Flusszelle 66
  höhere Empfindlichkeit erzielen 63
  höheren Durchsatz erzielen 55
  Injektionsvolumina 47
  Säulenverwendung 65

P

Partikel unter 2 µm 34
pH-Bereich 24
Pufferlösungen 11

R

Rechner
  Kosten 34
Reibungserwärmung 37
Retentionsfaktor 32
Richtigkeit der Zusammensetzung 25

S

Säulen
  Partikel unter 2 µm 34
Säulenthermostat
  Beschreibung 17
Säule
  Temperatur 37
  Thermostatisierung 37
Schnellstart-Anleitung
  Einführung 86
Sicherheit
  Allgemeine Informationen 106
  Standards 23
  Symbole 108
Sicherheitsklasse I 106
Spannungsbereich 23
Spezifikationen
  Analogsignalausgang 25
  Datenübertragung 25
  Leistung 24
  physikalische 23
  Steuerung und Datenauswertung 25
Spülen
  mit einer Pumpe 82
Steuerung und Datenauswertung 25
Steuerungseinheit 14
Stromverbrauch 23
Systemeinrichtung und Installation
  Netzwerkintegration 74
Systemkomponenten
  Diodenarray-Detektor 19
  Säulenthermostat 17
System
  Einschalten 87

T

Tabelle Integrationsereignisse 102
Technische Daten 23
Temperatur bei Nichtbetrieb 23
theoretische Böden 32
Totvolumen 40

Ü

überlappende Injektionen 51

U

Umgebungstemperatur bei Betrieb 23
Umgebungstemperatur bei Nichtbetrieb 23

V

Vakuumentgaser 26
Vakuumpumpe 14
Van-Deemter-Gleichung 29
Verschleppung 52, 53
Verstopfung von Säulen
  vermeiden 68
Verzögerungsvolumen
  automatischer Wechsel 42
  Beispiel 40
  Beschreibung 40

Z

Zwei in Serie geschaltete Kolben 11
Zykluszeit
    Gerätekonfiguration 49

www.agilent.com

Inhalt dieses Buchs

Dieses Handbuch enthält Informationen zum Binären LC Agilent 1260 Infinity.

Das Handbuch behandelt folgende Themen:

- Gerätebeschreibung,
- Einführung,
- Technische Daten und Leistungsdaten,
- Systemoptimierung,
- Einrichtung und Installation,
- Schnellstart-Anleitung.

© Agilent Technologies 2006, 2008-2011, 2013

Printed in Germany
02/2013

G1312-92303

Agilent Technologies